

**Untersuchungen zur Regulation ATP-sensitiver K⁺-Kanäle
durch Adeninnukleotide und zur Gewebselektivität
des oralen Antidiabetikums Nateglinid**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Bettina Neugebauer

aus

Braunschweig

1. Referentin:	PD Dr. med. C. Schwanstecher
2. Referent:	Prof. Dr. med. S. Herzig
eingereicht am:	13. Mai 2004
mündliche Prüfung am:	23. Juli 2004
Druckjahr:	2004

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation:

SCHWANSTECHER C, NEUGEBAUER B, SCHULZ M, SCHWANSTECHER M (2002): The common single nucleotide polymorphism E23K in $K_{IR6.2}$ sensitizes pancreatic β -cell ATP-sensitive potassium channels toward activation through nucleoside diphosphates. *Diabetes* 51 (Suppl.3): S1-S5.

Tagungsbeiträge:

NEUGEBAUER B, GROSS I, SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M: K_{ATP} channel control by non-hydrolysable nucleoside diphosphates. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl.): R 73, 277; 42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2001.

NEUGEBAUER B, GROSS I, SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M: K_{ATP} channel control by non-hydrolysable nucleoside diphosphates. *SPP1003 Struktur und Funktion ATP-sensitiver und einwärtsgerichteter Kaliumkanäle*. Wissenschaftstreffen 2001 von Schwerpunktprogrammen der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) in Berlin, September 2001.

NEUGEBAUER B, SCHULZ M, SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M: ATP acts as a partial antagonist at the activatory nucleotide site of K_{ATP} channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1): R 64, 243; 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2002.

SCHULZ M, NEUGEBAUER B, SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M: Stoichiometry of K_{ATP} channel closure through the low affinity site for ATP. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1): R 64, 242; 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2002.

SCHWANSTECHER C, NEUGEBAUER B, SCHULZ M, SCHWANSTECHER M: Two types of gating in K_{ATP} channel control. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1): R 64, 241; 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2002.

NEUGEBAUER B, SCHULZ M, SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M: ATP acts as a partial antagonist at the activatory nucleotide site of pancreatic K_{ATP} channels. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 1): 62, 3-7; 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Dresden, Mai 2002.

SCHULZ M, NEUGEBAUER B, SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M: Stoichiometry of K_{ATP} channel closure through the low affinity site for ATP. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 1): 62, 3-8; 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Dresden, Mai 2002.

- SCHWANSTECHE C, NEUGEBAUER B, SCHULZ M, SCHWANSTECHE M: Two types of gating in K_{ATP} channel control. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 1): 20, V-42; 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Dresden, Mai 2002.
- ECKERT B, NEUGEBAUER B, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M: Tissue selectivity of the antidiabetic agent nateglinide: study on recombinant human K_{ATP} -channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl.1): R 67, 255; 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie und 20. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung in Mainz, März 2003.
- NEUGEBAUER B, SCHULZ M, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M: ATP-sensitivity shift in K_{ATP} -channels induced by gating. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl. 1): R 67, 253; 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie und 20. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung in Mainz, März 2003.
- SCHULZ M, NEUGEBAUER M, SCHWANSTECHE M, SCHWANSTECHE C: Molecular basis for the antagonistic effects of ATP and ADP in K_{ATP} channel control. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl. 1): R 66, 251; 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie und 20. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung in Mainz, März 2003.
- SCHWANSTECHE C, SCHULZ M, NEUGEBAUER B, SCHWANSTECHE M: The frequent E23K polymorphism in $K_{IR6.2}$ reciprocally affects sensitivities of pancreatic β -cell K_{ATP} -channels for activatory and inhibitory adenine nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl.1): R 67, 254; 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie und 20. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung in Mainz, März 2003.
- ECKERT T, NEUGEBAUER B, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M: Tissue selectivity of the antidiabetic agent nateglinide: study on recombinant human K_{ATP} -channels. *Diabetes und Stoffwechsel* 12 (Suppl.1): 62, V-139; 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Bremen, Mai 2003.
- NEUGEBAUER B, SCHULZ M, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M: ATP-sensitivity shift in K_{ATP} -channels induced by gating. *Diabetes und Stoffwechsel* 12 (Suppl. 1): 1, V-2; 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Bremen, Mai 2003.
- SCHULZ M, NEUGEBAUER B, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M: Molecular basis for the antagonistic effects of ATP and ADP in K_{ATP} channel control. *Diabetes und Stoffwechsel* 12 (Suppl. 1): 1, V-3; 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Bremen, Mai 2003.
- SCHWANSTECHE C, SCHULZ M, NEUGEBAUER B, SCHWANSTECHE M: The frequent E23K polymorphism in $K_{IR6.2}$ reciprocally affects sensitivities of pancreatic β -cell K_{ATP} -channels for activatory and inhibitory adenine nucleotides. *Diabetes und Stoffwechsel* 12 (Suppl.1): 19, V-44; 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Bremen, Mai 2003.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Mai 2004 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Frau Privatdozentin Dr. med. C. Schwanstecher und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. M. Schwanstecher möchte ich für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieser sehr interessanten Themenstellung und die intensive Betreuung bei der Durchführung der Arbeit ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Haide Fürstenberg, Frau Claudia Ott, Frau Beate Pieper und Frau Carolin Rattunde (Molekularbiologie und Zellkultur) für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie Frau Ursula Herbort-Brand für die praktische Einführung in die molekularbiologischen Methoden.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig möchte ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre stete Diskussionsbereitschaft ebenfalls ausdrücklich danken.

Für meine Eltern.

*Auch der weiteste Weg beginnt
mit einem ersten Schritt.*

(Anonym)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	ATP-sensitive Kaliumkanäle	1
1.1.1	Vorkommen und Aufbau des K_{ATP} -Kanals	1
1.1.2	Die regulatorische Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit (SURx)	2
1.1.2.1	Humane Gene der Sulfonylharnstoffrezeptoren	2
1.1.2.2	Sulfonylharnstoffrezeptoren sind ABC-Proteine	2
1.1.2.3	Pharmakologische Charakterisierung der Sulfonylharnstoff-Rezeptoren	4
1.1.3	Die porenbildende Untereinheit des K_{ATP} -Kanals (Kir6.y)	4
1.1.3.1	Genetischer Hintergrund des Kir6.y-Proteins	4
1.1.3.2	Die Familie der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle	5
1.2	Funktion und Regulation der K_{ATP}-Kanäle in der B-Zelle des Pankreas	6
1.2.1	Stimulation der Insulinsekretion	6
1.2.2	Bedeutung der Nukleotide als Modulatoren der K_{ATP} -Kanalaktivität	8
1.3	Genetische Variationen im K_{ATP}-Kanal und ihre Folgen am Beispiel der Kir6.2-Untereinheit	9
1.4	Erzeugung von Tiermodellen humaner Erkrankungen unter Nutzung molekulargenetischer Techniken	10
1.4.1	Methoden und Ziele der Transgenesis	10
1.4.2	Transgene Tiere mit defektem oder modifiziertem K_{ATP} -Kanal der B-Zelle	10
1.5	Medikamentöse antihyperglykämische Therapie des Diabetes mellitus Typ 2	11
1.5.1	Therapieziele	11
1.5.2	Sulfonylharnstoff-Analoga in der Therapie des Typ-2-Diabetes: Nateglinid	12
1.5.2.1	Wirkung von Nateglinid	12
1.5.2.2	Hohe B-Zell-Selektivität senkt das Risiko von unerwünschten Wirkungen	13

INHALTSVERZEICHNIS

2	Ziele der Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Allgemeines	16
3.1.1	Chemikalien	16
3.1.2	Restriktionsenzyme und Primer	16
3.2	Molekularbiologische Methoden	16
3.2.1	Einführung von Punktmutationen	16
3.2.1.1	Verwendete Plasmide	16
3.2.1.2	Design der Oligonukleotid-Primer	17
3.2.1.3	Ausführung der PCR	18
3.2.1.4	Kontrolle des PCR-Produkts	19
3.2.2	Subklonierung von DNA-Fragmenten	19
3.2.3	Ligation	20
3.2.4	Kultivierung und Transformation von Bakterien	20
3.2.4.1	Kultivierung von Escherichia coli	20
3.2.4.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	21
3.2.4.3	Durchführung der Transformation	21
3.2.4.4	Anlegen von Glycerinkulturen	22
3.2.5	Isolierung von DNA	22
3.2.5.1	Plasmidpräparation	22
3.2.5.2	Isolierung von Cosmid-DNA	23
3.2.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	24
3.2.6	Sequenzierung	24
3.2.7	Identifizierung von Klonen mit speziellen DNA-Sequenzen	24
3.2.7.1	PCR-Screening	24
3.2.7.2	Untersuchung genomischer Cosmid-Klone über DNA-Hybridisierung	26
3.2.7.2.1	DNA-Auftrennung mittels Gel-Elektrophorese	26
3.2.7.2.2	Vorbehandlung des Gels für den Southern Blot	27
3.2.7.2.3	Southern Blot	27
3.2.7.2.4	Herstellung des DNA-Sonden-Templates für den Kir6.2 der Maus	28
3.2.7.2.5	Herstellung und Reinigung radioaktiv markierter Sonden	29
3.2.7.2.6	Hybridisierung	30

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.7.2.7	Nachweis der markierten DNA-Banden	31
3.2.8	Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung von COS-Zellen	32
3.2.8.1	Kultivierung von COS1- bzw. COS7-Zellen	32
3.2.8.2	Umsetzen der Zellen (Passagieren)	33
3.2.8.3	Kryokonservierung von COS-Zellen	33
3.2.9	Transfektion	34
3.2.9.1	Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode	34
3.2.9.2	Kotransfektion von SUR1 und zwei Kir6.2-Isoformen im Verhältnis 1:1 und 1:10	35
3.2.9.3	Histologische LacZ-Färbung	36
3.2.9.3.1	Färbung	36
3.2.9.3.2	Auswertung der Färbung	36
3.3	Gleichgewichtsbindungsexperimente an COS-Membranen	37
3.3.1	Präparation von Membranen aus COS-Zellen	37
3.3.2	Durchführung der Proteinbestimmung	38
3.3.3	Herstellung der Lösungen	38
3.3.3.1	Lösungen der Radioliganden	38
3.3.3.2	Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen	39
3.3.4	Filtrationsassay	39
3.3.4.1	Vorbereitung der Membranen	40
3.3.4.2	Inkubationen	40
3.3.4.3	Filtration und Szintillationszählung	41
3.4	Elektrophysiologische Registrierungen	41
3.4.1	Lösungen	41
3.4.1.1	Basislösungen	41
3.4.1.2	Lösungen der eingesetzten Nukleotide	42
3.4.1.3	Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen	43
3.4.2	Vorbereitung der Zellen	43
3.4.3	Durchführung der elektrophysiologischen Experimente	44
3.4.3.1	Herstellung der Pipetten	44
3.4.3.2	Aufbau des Patch-Clamp-Setups	44
3.4.3.3	Sealbildung und Patch-Clamp-Konfigurationen	45
3.4.3.4	Applikation der Testlösungen	46

INHALTSVERZEICHNIS

3.5	Datenauswertung	47
3.5.1	Statistik	47
3.5.2	Bindungsexperimente	47
3.5.2.1	Spezifische Bindung	47
3.5.2.2	Gleichgewichtsbindungen	47
3.5.2.3	Dissoziationskonstanten	48
3.5.3	Auswertung der Patch-Clamp-Experimente	48
3.5.3.1	Kurvenparameter	49
3.5.4	Berechnung der theoretischen Konzentrationshemmbeziehungen für die Stöchiometrie der Wirkung von Nateglinid	49
3.5.5	Theoretische Wahrscheinlichkeiten von Kanalsubtypen	51
3.5.5	Berechnung der theoretischen Aktivität für die ATP-Stöchiometrie in Gegenwart von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Interaktion zwischen Nukleosiddi- und -triphosphaten an den K_{ATP}-Kanälen der B-Zelle	53
4.1.1	Kanalaktivierung durch GDP reduziert die ATP-Empfindlichkeit	53
4.1.2	Stöchiometrie der ATP-Wirkung in Gegenwart von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten	55
4.1.3	Interaktion von GDP mit der inhibitorischen ATP-Bindungsstelle auf Kir6.2	57
4.1.4	Erhöhte Offenwahrscheinlichkeit induziert einen Zustand mit reduzierter Affinität gegenüber ATP	59
4.1.5	Effekt von aktivierendem GDP auf die Potenz unterschiedlicher inhibitorischer Nukleotide	62
4.2	Einfluss des Polymorphismus E23K auf die Aktivität von K_{ATP}-Kanälen des Pankreas in Gegenwart von Nukleosiddiphosphaten	64
4.2.1	Modulation der ATP-Wirkung in Gegenwart von GDP	64
4.2.2	Modulation der GDP-Wirkung	67
4.3	Konstruktion eines Targeting-Vektors zur Erzeugung eines Tiermodells mit dem Polymorphismus E23K	69
4.3.1	Gezielte Genveränderung durch homologe Rekombination	69
4.3.2	Suche nach muriner genomischer DNA mit dem Gen Kir6.2	69

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.2.1	Auswahl der geeigneten DNA-Bibliothek	69
4.3.2.2	Erstellung der Hybridisierungssonde	71
4.3.3	Kontrolle der im Screening-Verfahren positiv getesteten Cosmid-Klone	71
4.3.4	Charakterisierung der genomischen DNA in der Umgebung des Gens Kir6.2	73
4.3.5	Generierung des Polymorphismus E23K in der genomischen DNA	75
4.3.6	Einführung eines positiven Selektionsmarkers	76
4.3.7	Synthese des „Replacement-Vektors“	76
4.3.8	Überprüfung des Vektors auf die Funktionsfähigkeit der <i>loxP</i> -Stellen	78
4.4	Studie zur Gewebselektivität von Nateglinid an rekombinanten humanen pankreatischen und extrapancreatischen K_{ATP}-Kanälen	81
4.4.1	K _{ATP} -Kanäle der pankreatischen B-Zelle (SUR1/Kir6.2)	81
4.4.1.1	Bindung von Nateglinid an den humanen SUR1	81
4.4.1.2	Hemmung rekombinanter SUR1/Kir6.2-Kanäle durch Nateglinid	82
4.4.2	Rekombinante kardiovaskuläre K _{ATP} -Kanäle	84
4.4.2.1	Bindung von Nateglinid an die SUR2-Isoformen	84
4.4.2.2	Hemmung rekombinanter SUR2/Kir6.2-Kanäle durch Nateglinid	84
5	Diskussion	86
5.1	Aktivierung des K_{ATP}-Kanals induziert einen niederaffinen Zustand gegenüber inhibitorischen Nukleosidtriphosphaten	86
5.1.1	GDP reduziert die ATP-Empfindlichkeit der inhibitorischen Bindungsstelle	86
5.1.2	Stöchiometrie der ATP-Wirkung im niederaffinen Zustand	87
5.1.3	Niederaffiner Zustand als Folge der erhöhten Offenwahrscheinlichkeit	89
5.1.4	Physiologische Relevanz der Affinitätsverschiebung	93
5.2	E23K sensibilisiert die K_{ATP}-Kanäle der B-Zelle gegenüber der Wirkung aktivierender Nukleosiddiphosphate	93
5.3	Vorüberlegungen zur Erzeugung einer transgenen Maus als Träger des E23K-Polymorphismus	96

INHALTSVERZEICHNIS

5.4	Gewebsselektivität von Nateglinid	98
5.4.1	Nateglinid ist voller Agonist an der Sulfonylharnstoffbindungsstelle humaner K_{ATP} -Kanäle	98
5.4.2	Nateglinid besitzt hohe Selektivität für die humanen SUR1/Kir6.2-Kanäle der B-Zelle	100
5.4.3	Klinische Relevanz	102
6	Zusammenfassung	104
7	Literaturverzeichnis	109
8	Abkürzungsverzeichnis	120

1 EINLEITUNG

1.1 ATP-sensitive Kaliumkanäle

ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) sind als porenbildende, integrale Membranproteine in unterschiedlichen Körpergeweben an einem geregelten passiven Transport von K^+ -Ionen durch Membranen beteiligt. Ihrer Bezeichnung entsprechend werden sie dabei unter anderem durch das intrazelluläre ATP gehemmt und durch MgADP aktiviert (ASHCROFT und RORSMAN, 1989; ASHCROFT und GRIBBLE, 1998; AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999). Durch Registrierung der Veränderungen in den intrazellulären Adeninnukleotid-Konzentrationen koppeln sie den metabolischen Status der Zelle an die elektrische Aktivität der Plasmamembran und spielen auf diese Weise eine zentrale regulatorische Rolle in vielen physiologischen Prozessen. So sind sie beispielsweise involviert in diverse zelluläre Funktionen wie Hormonsekretion, Erregbarkeit von Neuronen und Muskeln sowie Schutz von Herz und Gehirn bei Ischämie (MIKI et al., 1999; MIKI und SEINO, 2003).

1.1.1 Vorkommen und Aufbau des K_{ATP} -Kanals

Die K_{ATP} -Kanäle sind mit tetradimerer Stöchiometrie $(SURx/Kir6.y)_4$ aus zwei strukturell verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt, einer regulatorischen Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit ($SURx$) und einer porenbildenden, einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanal-Untereinheit (Kir6.1 oder Kir6.2) (CLEMENT et al., 1997; AGUILAR-BRYAN et al., 1998; AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999; s. auch Abb. 1).

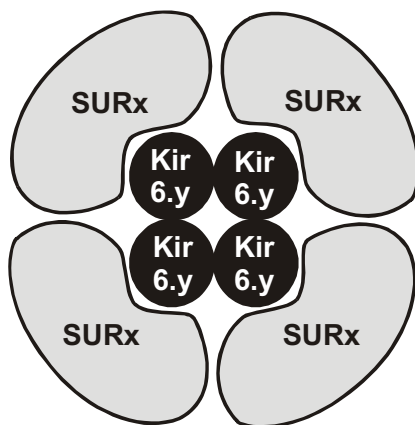


Abb. 1 Tetradimere Struktur ATP-sensitiver Kaliumkanäle (CLEMENT et al., 1997).

Der K_{ATP} -Kanal ist aus vier porenbildenden α -Untereinheiten Kir6.y und vier regulatorischen β -Untereinheiten $SURx$ zusammengesetzt.

EINLEITUNG

Der Sulfonylharnstoffrezeptor liegt in drei Isoformen vor, dem SUR1 sowie den zwei Splice-Varianten des SUR2-Gens, SUR2A und SUR2B, die nur in ihrem jeweiligen carboxy-terminalen Exon 38 differieren (INAGAKI et al., 1996; CHUTKOW et al., 1996; ISOMOTO et al., 1996; AGUILAR-BRYAN et al., 1998). Im Falle der Maus umfasst dieser Sequenzunterschied in den SUR2-Isoformen lediglich die letzten 42 Aminosäuren (ISOMOTO et al., 1996) und beim Menschen 45 Aminosäuren (AGUILAR-BRYAN et al., 1998). Während SUR1 und Kir6.2 den K_{ATP} -Kanal in den B-Zellen des Pankreas sowie in Neuronen rekonstituieren, repräsentiert die SUR2A/Kir6.2-Kombination die K_{ATP} -Kanäle in Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen (INAGAKI et al., 1995a; INAGAKI et al., 1996; OKUYAMA et al., 1998; BABENKO et al., 1998). Die K_{ATP} -Kanäle glatter Gefäßmuskelzellen werden dagegen aus SUR2B und Kir6.1 gebildet (ISOMOTO et al., 1996; YAMADA et al., 1997; HAMBROCK et al., 1998; SCHWANSTECHEER et al., 1998; RUSS et al., 1999; SEINO, 2003). Seit Verfügbarkeit entsprechender cDNAs der Kanal-untereinheiten ermöglicht die variable heterologe Koexpression verschiedener SUR_x- und Kir6._y-Untereinheiten eine Rekonstitution funktionsfähiger, gewebspezifischer K_{ATP} -Kanal-typen, die vergleichbare elektrophysiologische Eigenschaften und Empfindlichkeiten gegenüber Nukleotiden und pharmakologischen Substanzen aufweisen wie K_{ATP} -Kanäle aus nativen Geweben (SEINO und MIKI, 2003).

1.1.2 Die regulatorische Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit (SUR_x)

1.1.2.1 *Humane Gene der Sulfonylharnstoffrezeptoren*

Das humane SUR1-Gen (ABCC8) wurde auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p15.1) und das humane SUR2-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p11.12) lokalisiert. Beide umspannen mit ihren 39 bzw. 38 Exons jeweils einen Bereich von mehr als 100kb DNA (AGUILAR-BRYAN et al., 1998).

1.1.2.2 *Sulfonylharnstoffrezeptoren sind ABC-Proteine*

Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) zeigt strukturelle Verwandtschaft mit den Transportproteinen CFTR („Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“), MDR („Multidrug Resistance Protein“; entspricht dem P-Glykoprotein) sowie MRP („Multidrug Resistance-Associated Protein“) (AGUILAR-BRYAN et al., 1998; MIKI et al., 1999). Gemeinsam werden sie in die Familie der „ATP-bindenden Kassettenproteine“ (ABC-Proteine) eingeordnet, charakterisiert durch multiple transmembranäre Domänen (TMDs) und zwei Nukleotid bindende

EINLEITUNG

Regionen (NBF1 und NBF2) auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran (HIGGINS, 1992). Intakte NBFs sind für die Funktionsfähigkeit zahlreicher ABC-Proteine von entscheidender Bedeutung und enthalten dementsprechend hochkonservierte Sequenzbereiche bestehend aus Walker-A- und Walker-B-Motiven, die über eine Linker-Region miteinander verknüpft sind (WALKER et al., 1982; AGUILAR-BRYAN et al., 1998).

Basierend auf Hydrophobizitätsanalysen, Sequenzvergleichen zwischen SUR1 und der MRP-Familie (TUSNÁDY et al., 1997) sowie Immunofluoreszenzuntersuchungen (CONTI et al., 2001) wird für den SUR1 eine Topologie mit fünf (TMD0) und sechs (TMD1) transmembranären Segmenten vor NBF1 und weiteren sechs (TMD2) zwischen NBF1 und der carboxy-terminal lokalisierten NBF2 postuliert. Während sich der Amino-Terminus extrazellulär befindet, liegt der Carboxy-Terminus des Proteins im Intrazellulärraum.

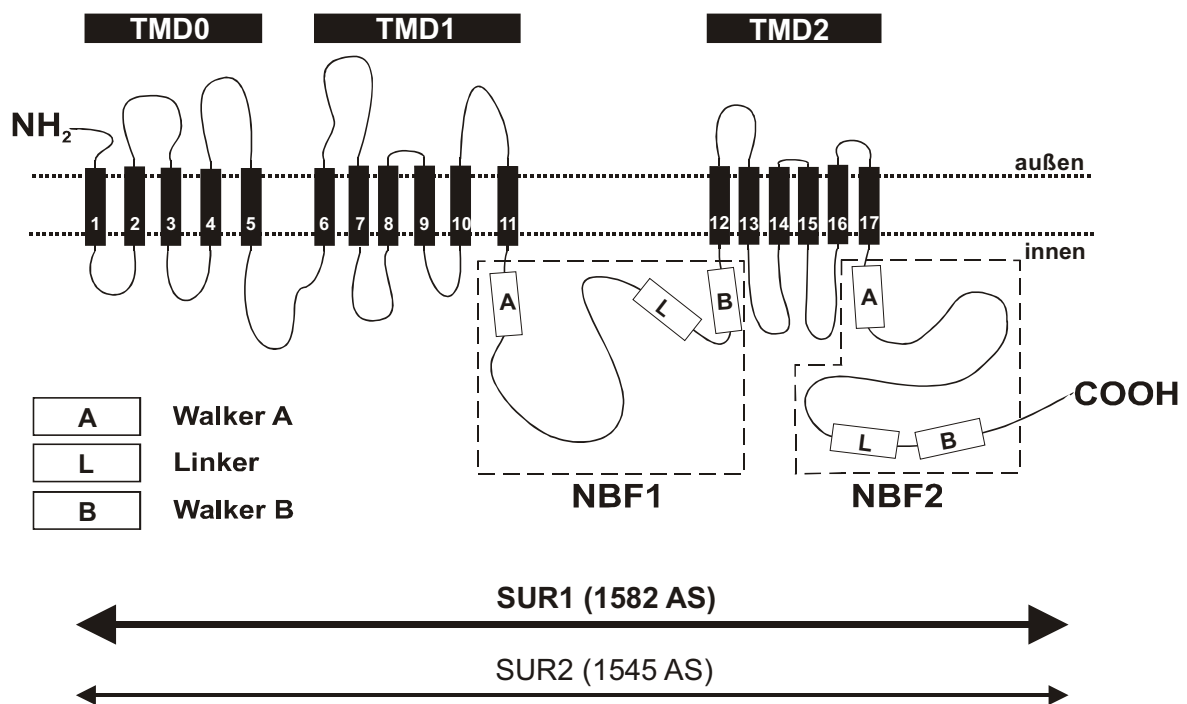


Abb. 2 Transmembranäre Topologie von SUR1 (nach CONTI et al., 2001).

TMD0 umfasst die transmembranären Segmente 1–5, TMD1 die Segmente 6–11 und TMD2 die Segmente 12–17. NBF1 und NBF2 kennzeichnen die intrazellulären Nukleotid bindenden Domänen, die jeweils Walker-A- und Walker-B-Sequenzen sowie eine Linker-Region enthalten. Während der SUR1 1582 Aminosäuren besitzt, bestehen die SUR2-Isoformen (SUR2A und SUR2B) aus 1545 Aminosäuren. Es ist zu vermuten, dass die SUR2-Isoformen aufgrund der strukturellen Homologie, ähnlicher Hydrophobizitätsprofile und Eigenschaften eine identische Topologie aufweisen (CONTI et al., 2001).

1.1.2.3 Pharmakologische Charakterisierung der Sulfonylharnstoffrezeptoren

Inhibitorisch wirkende Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamid, Tolbutamid, Glipizid), Kaliumkanalöffner (z.B. Diazoxid, Pinacidil) und aktivierende Nukleosiddiphosphate (z.B. MgADP und MgGDP) beeinflussen die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle durch Interaktion mit der Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit (AGUILAR-BRYAN et al., 1998; AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999; ASHCROFT und GRIBBLE, 1999). Dabei verleihen die verschiedenen SURx-Untereinheiten den K_{ATP} -Kanälen ihre gewebspezifische Pharmakologie. So vermitteln die SUR2-Isoformen hohe Affinität gegenüber Kaliumkanalöffnern wie den Cyanoguanidinen Pinacidil und P1075 und niedrige Affinität gegenüber Sulfonylharnstoffen wie Glibenclamid, während der SUR1-Typ inverse Eigenschaften induziert (INAGAKI et al., 1995a und 1996; ISOMOTO et al., 1996; GRIBBLE et al., 1998b; SCHWANSTECHEER et al., 1998; DÖRSCHNER et al., 1999; UHDE et al., 1999). Die Rezeptorbindungsstellen für Sulfonylharnstoffe und Kaliumkanalöffner sind negativ allosterisch aneinander gekoppelt (SCHWANSTECHEER et al., 1990, 1991a und b, 1992a, c, d und e; BRAY und QUAST, 1992; TOMAN, 2001). Aus diesem Grund ist in Bindungsstudien eine indirekte Bestimmung der Affinität von niederaffin bindenden Liganden der Sulfonylharnstoffrezeptoren möglich (SCHWANSTECHEER et al., 1998; SIEVERDING, 1998; DÖRSCHNER et al., 1999; TOMAN, 2001). Untersuchungen zur Stöchiometrie belegen, dass das Besetzen einer einzigen der vier äquivalenten Sulfonylharnstoff- bzw. Kaliumkanalöffner-Bindungsstellen pro Kanalkomplex durch den entsprechenden Liganden ausreicht, um die jeweilige inhibitorische oder aktivierende Wirkung zu entfalten (DÖRSCHNER et al., 1999; GROSS et al., 1999).

1.1.3 Die porenbildende Untereinheit des K_{ATP} -Kanals (Kir6.y)

1.1.3.1 Genetischer Hintergrund des Kir6.y-Proteins

Bisher sind zwei verwandte Kir-Gene identifiziert worden, die nach Koexpression mit SUR-cDNA funktionsfähige K_{ATP} -Kanäle ausbilden, Kir6.1 und Kir6.2. Durch Verwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungstechnik (INAGAKI et al., 1995b; als Übersichtsartikel s. AGUILAR-BRYAN et al., 1998) erfolgte die Lokalisation des humanen Kir6.1-Gens (KCNJ8) auf Chromosom 12 in Position 12p11.23 in unmittelbarer Nähe des SUR2-Gens. Mit drei Exons besitzt das Gen eine Länge von ~9,7kb und codiert ein Protein aus 424 Aminosäuren. Die mit 390 Aminosäuren zu 71% identische, etwas kleinere Kir6.2-Untereinheit basiert auf dem intronlosen humanen Kir6.2-Gen (KCNJ11), welches im Abstand von ~4,5kb in

3'-Richtung hinter dem SUR1-Gen auf Chromosom 11 liegt (INAGAKI et al., 1995a; als Übersichtsartikel s. AGUILAR-BRYAN et al., 1998).

1.1.3.2 Die Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle

Sequenzübereinstimmungen weisen beide Kir6.y-Isoformen als Mitglieder der großen Familie der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (Kir-Superfamilie) aus, die selbst in insgesamt sieben Subtypen aufgeteilt ist (als Übersichtsartikel s. NICHOLS und LOPATIN, 1997). Zu den gemeinsamen Strukturen zählen zwei transmembranäre Domänen, M1 und M2, die eine Schleife („H5-loop“ oder „P-loop“) flankieren, welche eine kritische, die hohe Selektivität für K^+ -Ionen vermittelnde Aminosäuresequenz (GlyPheGly-Motiv) trägt (DOUPNIK et al., 1995; AGUILAR-BRYAN et al., 1998). Sowohl Amino- als auch Carboxy-Terminus des porenbildenden Proteins befinden sich auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Membran. Die Pore wird durch jeweils vier zusammengelagerte Kir-Untereinheiten geformt.

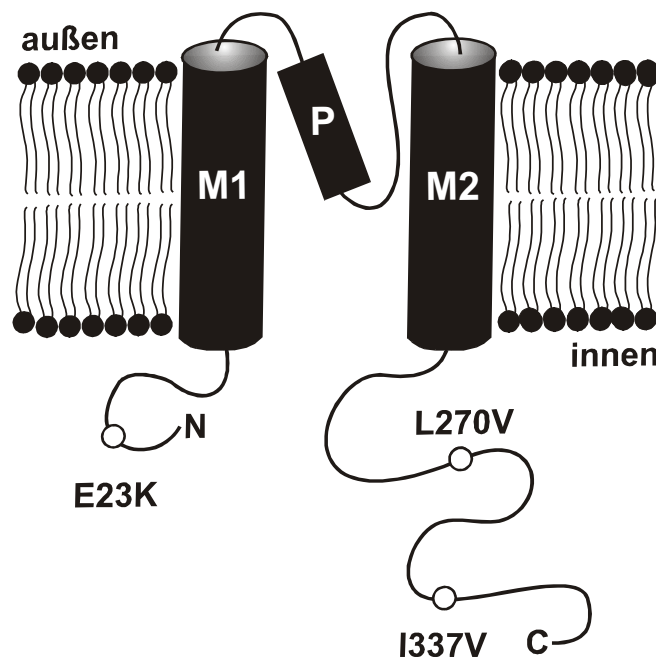


Abb. 3 Transmembranäre Topologie des Kir6.2 (Abb. in Anlehnung an MEYER, 2002). M1 und M2 kennzeichnen die transmembranären Helices, N den Amino-Terminus und C den Carboxy-Terminus. Das GlyPheGly-Motiv im Bereich der „P-loop“ (P) besitzt kritische Bedeutung für die K^+ -Selektivität (MACKINNON, 1995). Zusätzlich sind die drei häufig vorkommenden codierenden Polymorphismen in Kir6.2 angegeben. E23K (gag → aag) befindet sich im Amino-Terminus, L270V (ctg → gtg) und I337V (atc → gtc) sind im Carboxy-Terminus lokalisiert.

Im Gegensatz zur SUR-Untereinheit fehlen der Kir-Untereinheit eindeutig erkennbare Nukleotid bindende Regionen. Dennoch gelang durch isolierte Expression carboxyterminaler Deletionsmutanten Kir6.2 Δ C26 bzw. Kir6.2 Δ 36 in Abwesenheit jeglicher SUR-Isoformen die Generierung von K⁺-Kanälen unter Bewahrung einer reduzierten ATP-Sensitivität, bei gleichzeitigem Verlust aller weiteren regulatorischen Eigenschaften wie der Empfindlichkeit gegenüber Sulfonylharnstoffen, Kaliumkanalöffnern sowie aktivierenden Nukleosiddiphosphaten (TUCKER et al., 1997).

Als schwache Einwärtsgleichrichter erlauben die K_{ATP}-Kanäle noch einen schwachen Auswärtsstrom bei positivem Potenzial, wobei der Einwärtsfluss von K⁺-Ionen bei negativem Potenzial allerdings stets größer ist als der Auswärtsfluss bei betragsgleichem entgegengesetzten Potenzial (NICHOLS und LOPATIN, 1997). Diese Gleichrichterfunktion beruht auf der Anwesenheit freier Mg²⁺-Ionen und positiv geladener Polyamine (wie Spermin, Spermidin und Putrescin) an der intrazellulären Kanalöffnung, welche über eine spannungsabhängige Einlagerung in die Pore und deren Blockade den K⁺-Durchfluss behindern (NICHOLS und LOPATIN, 1997; AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999). Die hohe Leitfähigkeit für Einwärtsströme bei Membranpotenzialen unterhalb des K⁺-Gleichgewichtspotenzials ermöglicht einer Zelle mit stark oder schwach einwärtsgleichrichtenden K⁺-Kanälen die Aufrechterhaltung eines stabilen Ruhemembranpotenzials.

1.2 Funktion und Regulation der K_{ATP}-Kanäle in der B-Zelle des Pankreas

1.2.1 Stimulation der Insulinsekretion

K_{ATP}-Kanäle vom Typ SUR1/Kir6.2 spielen in den B-Zellen des Pankreas eine kritische Rolle in der Glucose-stimulierten Insulinsekretion. Die Sekretionsrate von Insulin wird durch unterschiedliche nutritive (u.a. Aminosäuren, Fettsäuren), hormonelle (Glucagon, „Glucagon-like-Peptide“) sowie neuronale (Tonus des autonomen Nervensystems) Faktoren modifiziert, wobei der Regulation durch den Plasmaglucosespiegel jedoch die physiologisch größte Bedeutung zukommt (BELL und POLONSKY, 2001). Glucose gelangt über GLUT2 vermittelte Diffusion in die B-Zellen, wo sie metabolisiert wird. Der Umfang von Glykolyse und Pyruvatbildung wird dabei durch eine Glucokinase determiniert, welche das Substrat Glucose über einen ersten Phosphorylierungsschritt in Glucose-6-phosphat umwandelt (NEWGARD und MCGARRY, 1995; MATSCHINSKY, 1996; s. auch Abb. 4). Ein Teil des gebildeten Pyruvats wird zur weiteren oxidativen Metabolisierung in den mitochondrialen Citratzyklus eingeschleust (NEWGARD und MCGARRY, 1995; WOLLHEIM, 2000) und der folgende Elektronentransfer

EINLEITUNG

über NADH und FADH_2 zur Atmungskette initiiert die Produktion von ATP, welches an das Zytosol abgegeben wird. Hier führt der Anstieg des ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisses zu einer Abnahme der K^+ -Leitfähigkeit der Plasmamembran (RORSMAN, 1997).

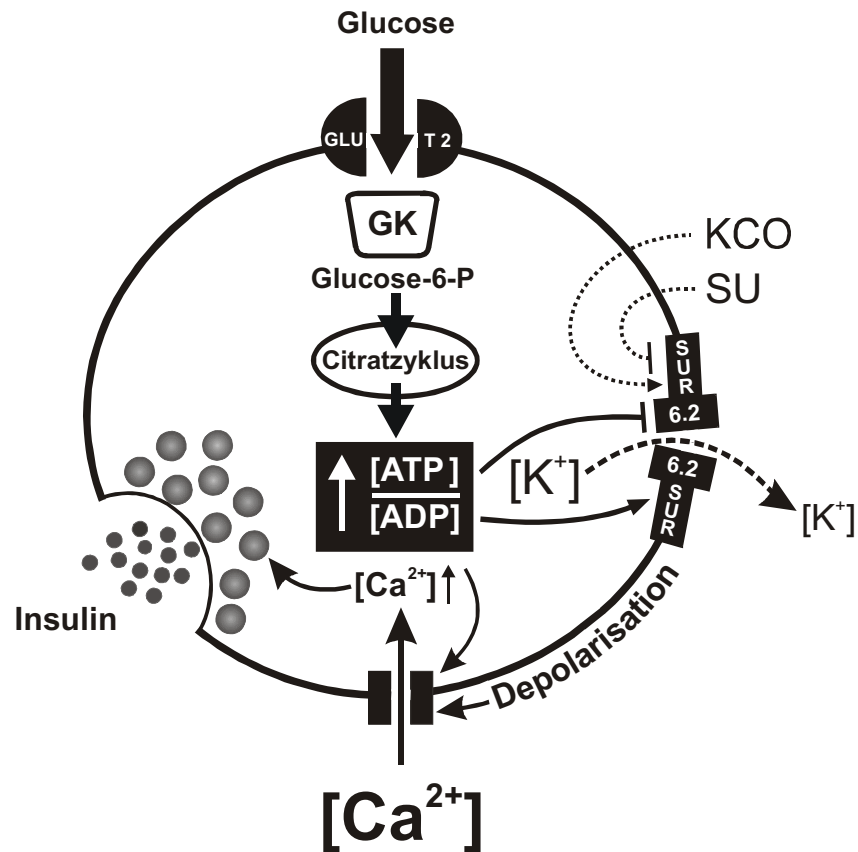


Abb. 4 *Stimulation der Insulinsekretion in der B-Zelle des Pankreas* (Abb. in Anlehnung an SCHWANSTECHER und SCHWANSTECHER, 2002).

Eine Zunahme der extrazellulären Glucosekonzentration bewirkt eine erhöhte Glucoseaufnahme über den Glucosetransporter GLUT2 in die pankreatische B-Zelle und steigert die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat (Glucose-6-P) durch die Glucokinase (GK), dem geschwindigkeitsbegrenzenden Enzym für die Metabolisierung von Glucose in der B-Zelle. Durch die Glykolyse entsteht Pyruvat, welches in die Mitochondrien aufgenommen und dem Citratzyklus zugeführt wird. Der resultierende Anstieg im ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis führt zur Abnahme der K_{ATP} -Kanalaktivität, Depolarisation der Plasmamembran, Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, was die Exozytose von Insulin triggert. Sulfonyleuree (SU) hemmen den K_{ATP} -Kanal und initiieren auf diese Weise dieselbe Reaktionsfolge, wohingegen Kaliumkanalöffner (KCOs) den Kanal aktivieren, die Plasmamembran hyperpolarisieren, die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration senken und dadurch die Insulinfreisetzung reduzieren.

Fällt der Anteil offener K_{ATP} -Kanäle von 6–8% in der ruhenden B-Zelle auf unter 2–3% (in der Regel ab einer Glucosekonzentration von ungefähr 6mM), hat dies ein relatives Überwiegen von Na^+ -Einwärtsströmen zur Folge mit der Konsequenz einer zunehmenden Membrandepolarisation (als Übersichtsartikel s. PANTEN et al., 1992). Daraus resultiert die

Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und damit assoziiert ein gesteigerter Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol. Die Anhebung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration löst schließlich die exozytotische Freisetzung von Insulin aus (RORSMAN, 1997; LANG, 1999). Neben Glucose stimulieren Sulfonylharnstoffe, wie beispielsweise Glibenclamid und Tolbutamid, die Insulinausschüttung durch direkte Hemmung der K_{ATP} -Kanäle über eine Interaktion mit der Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit, wohingegen Kaliumkanalöffner, wie z. B. Diazoxid, mit entgegengesetzter Wirkung die Insulinabgabe aus den B-Zellen über eine Hyperpolarisation der Zellmembran senken (TRUBE et al., 1986; als Übersichtsartikel s. z. B. ASHCROFT und RORSMAN, 1989; DUNNE und PETERSEN, 1991).

1.2.2 Bedeutung der Nukleotide als Modulatoren der K_{ATP} -Kanalaktivität

Die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials in der pankreatischen B-Zelle und die Registrierung des wechselnden metabolischen Status anhand der fluktuierenden intrazellulären Nukleotidkonzentrationen und dessen Verknüpfung mit dem Membranpotenzial wird offensichtlich überwiegend durch die K_{ATP} -Kanäle realisiert. Allerdings sind die genauen physiologischen Kontrollmechanismen der Kanäle bisher noch ungeklärt.

In der intakten B-Zelle sind neben dem inhibitorisch wirksamen ATP vermutlich noch zahlreiche weitere zytosolische Faktoren wie Nukleosiddiphosphate (z. B. ADP und GDP), Oleoyl-CoA (BRANSTROM et al., 1997; GRIBBLE et al., 1998a) sowie das Membranphospholipid PIP_2 (FAN und MAKIELSKI, 1997; BAUKROWITZ et al., 1998; SHYNG und NICHOLS, 1998) an der Regulation der K_{ATP} -Kanalaktivität beteiligt, wobei ADP dabei wahrscheinlich die wichtigste Rolle zukommt (ASHCROFT und GRIBBLE, 1999). Der Komplex aus ADP und einem Mg^{2+} -Ion führt sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ATP zu einer ausgeprägten Aktivierung der Kanäle durch Interaktion mit einer auf der SUR-Untereinheit gelegenen Nukleotidbindungsstelle (GRIBBLE et al., 1997a; TRAPP et al., 1997). Daneben stimulieren aber auch die Nukleotide GDP, GTP und UDP in Mg^{2+} -komplexierter Form die K_{ATP} -Kanalaktivität, während freies ADP und freies GTP den Anteil offener Kanäle deutlich reduzieren (SCHWANSTECHER et al., 1994; ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Der inhibitorische Effekt von ATP ist auch durch nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga wie AMP-PNP und AMP-PCP imitierbar, wobei das Besetzen einer einzigen der vier inhibitorischen Kir6.2-Bindungsstellen pro Kanalkomplex ausreicht, um den Kanal zu schließen (MARKWORTH et al., 2000).

1.3 Genetische Variationen im K_{ATP} -Kanal und ihre Folgen am Beispiel der Kir6.2-Untereinheit

Aufgrund seiner Schlüsselfunktion in der Regulation der Glucose-induzierten Insulinsekretion kann ein genetisch modifizierter K_{ATP} -Kanal der B-Zelle Störungen in der Glucose-Homöostase verursachen, die sich als Diabetes mellitus oder Erkrankungen mit hypoglykämischem Erscheinungsbild manifestieren (MIKI et al., 1999; KOSTER et al., 2000; SCHWANSTECHEER und SCHWANSTECHEER, 2002; HUOPIO et al., 2002). Im Allgemeinen wird Typ-2-Diabetes als eine polygenetische Funktionsstörung verstanden, wobei sowohl Erb- als auch Umweltfaktoren die Krankheitsentwicklung beeinflussen (POLONSKY et al., 1996). E23K (Substitution von Glutamat [E] in Position 23 durch Lysin [K]) ist einer von drei häufig vorkommenden „Single-Nucleotide“-Polymorphismen (SNPs), die in der porenbildenden Untereinheit Kir6.2 des K_{ATP} -Kanals der B-Zelle beobachtet werden (E23K, L270V, I337V; s. 1.1.3.2, Abb.3) (SAKURA et al., 1996) und somit eine potenzielle Bedeutung für die Entstehung von Typ-2-Diabetes besitzen. In Patch-Clamp-Untersuchungen an rekombinanten humanen K_{ATP} -Kanälen vom Typ SUR1/Kir6.2 blieben die Polymorphismen L270V und I337V ohne Einfluss auf die Eigenschaften der rekonstituierten Kanäle, während E23K eine signifikante Zunahme ihrer spontanen Offenwahrscheinlichkeit bewirkte (SCHWANSTECHEER et al., 2002). Dieser Anstieg in der Offenwahrscheinlichkeit ging mit einer diskreten Reduktion der Empfindlichkeit gegenüber inhibitorisch wirksamem ATP einher, in den Modellen für den heterozygoten (E/K mit E in Position 23 des Kir6.2 in einem Allel und K in dem anderen) und homozygoten (K/K mit K in Position 23 des Kir6.2 in beiden Allelen) Genotyp um das 1,4fache bzw. 2,2fache. Wahrscheinlich tragen beide Effekte zu einer Rechtsverschiebung der ATP-Konzentration bei, die notwendig ist, um 98% der Kanalaktivität zu unterdrücken. Erst wenn dieser Schwellenwert erreicht ist, wird an der intakten B-Zelle die Insulinsekretion ausgelöst (als Übersichtsartikel s. PANTEN et al., 1992). B-Zellen mit Kir6.2_{E23K}-mutanten Kanälen zeigen daher vermutlich eine leichte Hyperpolarisation ihrer Plasmamembran und damit eine diskrete Hemmung der Insulinfreisetzung (s. auch 5.2). Die genauen Auswirkungen des Polymorphismus E23K auf intakte B-Zellen, in denen sich neben inhibitorischem ATP weitere Faktoren, wie z.B. MgADP, an der komplexen Regulation der Kanalaktivität beteiligen (s. 1.2), sind bisher ungeklärt.

1.4 Erzeugung von Tiermodellen humaner Erkrankungen unter Nutzung molekulargenetischer Techniken

1.4.1 Methoden und Ziele der Transgenese

Häufig erlauben die üblichen Zellkulturtechniken zwar Aussagen über einzelne Zellen, wobei sich diese aber nicht unbedingt in jedem Fall auf den Gesamtorganismus übertragen lassen. Die Gentransfertechnologie bietet neuartige Verfahren zur Analyse von Genfunktionen sowie physiologischen Regulationselementen. Durch Aufklärung der molekularen Ursachen von Krankheiten und Generierung von präzisen Tiermodellen für beispielsweise humane Stoffwechselerkrankungen, besteht nun die Möglichkeit, alternative Therapiestrategien zu entwickeln und toxikologische Wirkungen frühzeitig zu erkennen (RUDOLPH und MÖHLER, 1999). Dabei wird mittels retroviraler Vektoren, über Mikroinjektion fremder DNA oder durch Transfektion embryonaler Stammzellen eine Keimbahnmutagenese („Transgenese“) vorgenommen. Ziel ist die Etablierung eines Tierstammes, der im Vergleich zum Ausgangsstamm in all seinen Zellen eine bestimmte genetische Veränderung trägt. Diese genetischen Modifikationen im Genom der Keimbahnzellen können sowohl die Inaktivierung bzw. Entfernung eines endogenen Gens mit einem vollständigen Verlust des Genproduktes beinhalten („Knock-out“) als auch die ungerichtete Integration von fremder genetischer Information bzw. das gezielte Ersetzen von Wildtyp-Allelen durch mutante Allele, die sich nur in einer einzigen bzw. in einigen wenigen Basen voneinander unterscheiden („Knock-in“). Nach Passage der Keimbahn vererbt sich das modifizierte Gen dann nach den mendelschen Regeln.

1.4.2 Transgene Tiere mit defektem oder modifiziertem K_{ATP} -Kanal der B-Zelle

Auf diese Weise sind bis jetzt bereits neun genetisch manipulierte Mauslinien erzeugt worden, denen entweder eine Untereinheit des K_{ATP} -Kanals fehlt oder die mutante Untereinheiten mit veränderten Funktionen in ihren Geweben exprimieren (SEINO und MIKI, 2003). In den B-Zellen des Pankreas transgener Mäuse mit der dominant negativen Kir6.2_{G132S}-Mutation führt der Verlust der K_{ATP} -Kanalfunktion zu einer chronischen Membrandepolarisation und einer erhöhten basalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was bei Neugeborenen eine ungesteuerte Insulinausschüttung verbunden mit Hypoglykämie induziert und später bei ausgewachsenen Tieren infolge eines apoptotischen Zelluntergangs in einer hyperglykämischen Stoffwechsellage mündet (MIKI et al., 1997). Kir6.2_{G132S}-mutante Mäuse stellen somit ein geeignetes Tiermodell für die „Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kleinkindes“

(PHHI)¹ dar. Eine weitere dominant negative Modifikation in der hochkonservierten Region der Kir6.2-Untereinheit, bei der die drei aufeinander folgenden Aminosäuren Glycin, Phenylalanin und Glycin in den Positionen 132, 133 und 134 jeweils durch Alanin substituiert worden sind (Kir6.2^{132A}133A^{134A}), zeigt dagegen kaum einen Effekt auf Insulinsekretion und Glucose-Homöostase (KOSTER et al., 2000). Transgene Mäuse mit einer Deletionsmutante des Kir6.2 (Kir6.2ΔN2–30), die eine reduzierte ATP-Empfindlichkeit aufweist, entwickeln eine schwere Hypoinsulinämie begleitet von Hyperglykämie und Ketoazidose und versterben typischerweise bereits in den ersten fünf Tagen nach der Geburt (KOSTER et al., 2000).

Der komplette Verlust von K_{ATP}-Kanaluntereinheiten in Kir6.2^{-/-} (MIKI et al., 1998)² bzw. SUR1^{-/-}-Mäusen (SEGHERS et al., 2000)³ geht ebenfalls mit einer stark eingeschränkten oder fehlenden Glucose-sowie Sulfonylharnstoff-stimulierten Insulinsekretion einher. Dennoch zeigten weder die neugeborenen noch die adulten Kir6.2- bzw. SUR1-„Knock-out“-Tiere eine persistierende Hyperglykämie. Folge bei beiden – nur geringfügig differierenden – Phänotypen war lediglich eine milde Glucose-Intoleranz mit nahezu normalen Blutglucosespiegeln (DOLIBA et al., 2004).

Letztlich repräsentiert daher keines dieser bisher beschriebenen transgenen Tiere ein geeignetes Modell zum Studium des Typ-2-Diabetes (s. 1.5.1).

1.5 Medikamentöse antihyperglykämische Therapie des Diabetes mellitus Typ 2

1.5.1 Therapieziele

Der Diabetes mellitus ist durch einen absoluten oder relativen Mangel an Insulin mit der Folge einer chronischen Hyperglykämie charakterisiert. Anhand ätiologischer, pathogenetischer und klinischer Gesichtspunkte werden dabei zwei Diabetes-Typen unterschieden. Der Typ-1-Diabetes ist die Folge einer autoimmunologischen Zerstörung der Insulin produzierenden B-Zellen im Pankreas, manifestiert sich normalerweise in jungen Jahren und erfordert immer eine Insulinsubstitution (BELL und POLONSKY, 2001). Beim Typ-2-Diabetes verhalten sich Muskel- und Fettzellen „resistent“ gegenüber der Wirkung von Insulin und die kompensatorischen Mechanismen, die in der B-Zelle eine verstärkte Insulinsekretion auslösen, reichen

¹ PHHI verfügt über ein heterogenes klinisches Erscheinungsbild, charakterisiert durch eine anhaltende, ausgeprägte Hypoglykämie in Kombination mit einer unangemessenen, exzessiven Insulinsekretion.

² Die Kir6.2^{-/-}-Maus ist eine homozygote Kir6.2-„Knock-out“-Maus, der aufgrund einer Genunterbrechung in beiden Allelen die Kir6.2-Untereinheit des K_{ATP}-Kanals komplett fehlt.

³ Die homozygote SUR1^{-/-}-Maus (SUR1^{-/-}) exprimiert keine SUR1-Untereinheit, da das entsprechende Gen auf beiden Allelen gleichzeitig inaktiviert worden ist.

nicht aus, um den Blutglucosespiegel im normalen physiologischen Bereich zu halten (BELL und POLONSKY, 2001). In diesem Fall (etwa 90% aller Diabetiker) entwickelt sich die Krankheit meist erst mit zunehmendem Alter und ist in der Regel mit Diätmaßnahmen, gegebenenfalls in Kombination mit oralen Antidiabetika, gut behandelbar. Aus unzureichend eingestellten Blutglucosespiegeln können bei beiden Typen neben akuten Stoffwechselentgleisungen über die Jahre auch schwere mikro- bzw. makrovaskuläre Spätkomplikationen hervorgehen. Spätschäden wie Herzinfarkt oder Schlaganfall, Blindheit, Neuro- sowie Nephropathien verkürzen die Lebenserwartung des Diabetikers und beeinträchtigen seine Lebensqualität erheblich. Um das Risiko des Auftretens von Organschäden zu minimieren, ist ab der Diagnosestellung eine intensive Kontrolle und sorgfältige Einstellung des Blutglucosespiegels (Anteil an glycosyliertem Hämoglobin im Blut „HbA_{1c}“ niedriger als 7%) unabdingbar (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP [UKPDS], 1998).

1.5.2 Sulfonylharnstoff-Analoga in der Therapie des Typ-2-Diabetes: Nateglinid

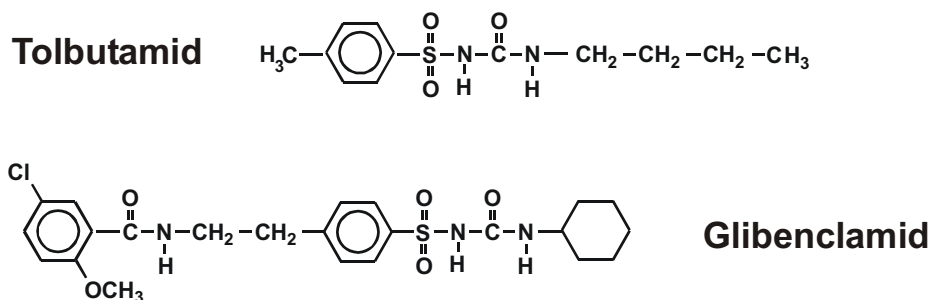
1.5.2.1 Wirkung von Nateglinid

Erst wenn die Stoffwechselstörungen durch Diätmaßnahmen und eine Steigerung der körperlichen Aktivität allein nicht kompensiert werden können, sind zusätzlich der Einsatz oraler Antidiabetika oder eine Insulinapplikation indiziert. Zur Gruppe der für die Therapie des Typ-2-Diabetes zugelassenen oralen Antidiabetika gehören α -Glucosidase-Inhibitoren, das Biguanid Metformin, Sulfonylharnstoffe und ihre Analoga sowie die Insulinsensitizer (Glitazone) (als Übersichtsartikel s. HÄRING et al., 2002). Die insulintropen Sulfonylharnstoffe, wie z. B. Glibenclamid und Tolbutamid, stimulieren die Freisetzung von Insulin durch eine Blockade der K_{ATP}-Kanäle in den B-Zellen des Pankreas über Bindung an den Sulfonylharnstoffrezeptor, sofern die körpereigene Insulinproduktion wenigstens teilweise erhalten ist (s. auch 1.2.1). Der Effekt ist dabei unabhängig von der Anwesenheit insulintroper Nährstoffe wie Glucose oder anderer Stimuli der Insulinsekretion (MALAISSE et al., 1967; GORUS et al., 1988). Aufgrund einer maximalen, schwer steuerbaren Insulinausschüttung nach Einnahme stark und lang wirksamer Sulfonylharnstoffe gehen mit der angestrebten Blutzuckersenkung häufig auch unerwünschte Wirkungen, beispielsweise ausgeprägte hypoglykämische Reaktionen und eine Hyperinsulinämie einher. Die Entwicklung der neuen verwandten Substanzen Repaglinid (deutsche Erstzulassung im Jahr 1998) und Nateglinid (in Deutschland zugelassen seit 2001) erfolgte mit dem Ziel, das Auftreten dieser hypoglykämischen Zustände zu reduzieren und das Risiko einer Erschöpfung der B-Zellen aufgrund gesteigerter Sekretionsleistung

EINLEITUNG

zu verringern. Innerhalb von 1 bis 30 Minuten vor den Mahlzeiten eingenommen, imitiert Nateglinid durch seinen raschen Wirkungseintritt und eine kurze Wirkdauer die physiologische postprandiale Insulinfreisetzung und minimiert auf diese Weise die postprandiale Hyperglykämie mit einer gleichzeitig geringen Neigung zur Induktion von Hypoglykämien (HU et al., 2003).

A



B

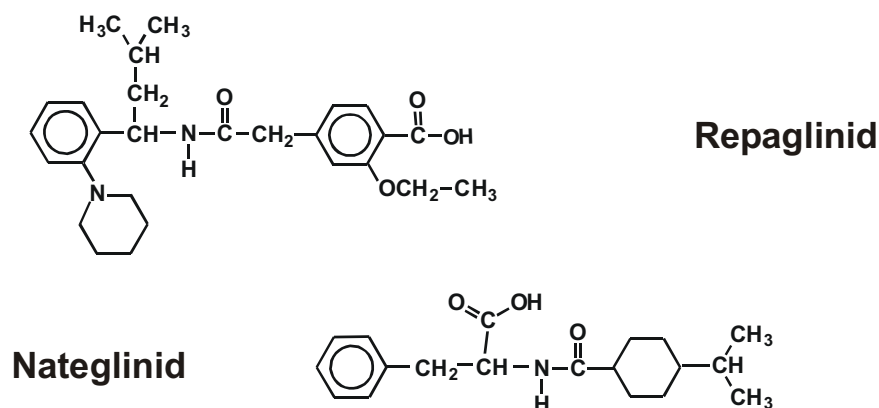


Abb. 5 *Insulintrope orale Antidiabetika.*

Strukturformeln der Sulfonylharnstoffe Tolbutamid und Glibenclamid (A) sowie des Benzoesäure-Derivates Repaglinid und des D-Phenylalanin-Derivates Nateglinid (B).

1.5.2.2 Hohe B-Zell-Selektivität senkt das Risiko von unerwünschten Wirkungen

Obwohl das D-Phenylalanin-Derivat Nateglinid weder eine Sulfonylharnstoff- noch eine Benzamidstruktur (s. 1.5.2.1, Abb. 5) besitzt, entfaltet es seine insulinsekretionssteigernde Wirkung offenbar ebenfalls über die hochaffine Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe auf der SUR1-Untereinheit des K_{ATP} -Kanals der B-Zelle (HU et al., 2000; SUNAGA et al., 2001; CHACHIN et al., 2003). K_{ATP} -Kanäle werden in vielen unterschiedlichen Körpergeweben

EINLEITUNG

exprimiert und spielen eine wichtige physiologische und pathophysiologische Rolle. Während sie in den B-Zellen des Pankreas die Schwankungen des Blutglucosespiegels an die Insulinsekretion koppeln (ASHCROFT und RORSMAN 1989), sind sie in den Herzmuskelzellen an einer zellprotektiven Verkürzung der Aktionspotenzialdauer unter ischämischen Bedingungen und in glatten Gefäßmuskelzellen an der Regulation des Tonus beteiligt (NICHOLS und LEDERER 1991; MIKI et al., 2002). In den Skelettmuskelzellen könnten sie zu einem gesteigerten K^+ -Efflux und zu Erschöpfung unter schwerer körperlicher Belastung beitragen (DAVIS et al., 1991). Ihre physiologische Funktion in Neuronen ist noch nicht vollständig geklärt, aber möglicherweise sind die K_{ATP} -Kanäle im Bereich des ventromedialen Hypothalamus an der Aufrechterhaltung der Glucose-Homöostase beteiligt, in dem sie die Ausschüttung von Gegenspielern des Insulins wie Glucagon und Katecholaminen beeinflussen (MIKI et al., 2001). Daneben modulieren neuronale K_{ATP} -Kanäle vermutlich die synaptische Transmitterfreisetzung (SCHMID-ANTOMARCHI et al., 1990) und bewahren das Gehirn durch Senkung der Aktionspotenzialfrequenz bei zerebraler Ischämie oder Hypoxie vor neuronalen Schäden und Degeneration von Neuronen (HEURTEAUX et al., 1993; ZAWAR und NEUMCKE, 2000; YAMADA et al., 2001). Die Kanäle in diesen Geweben setzen sich aus unterschiedlichen SUR- und Kir-Isoformen zusammen (s. 1.1.1), was ihnen ihre jeweiligen gewebsspezifischen pharmakologischen Eigenschaften verleiht. Für K_{ATP} -Kanal blockierende, insulintropische Wirkstoffe in der Diabetes-Therapie ist eine hohe B-Zell-Selektivität von zentraler Bedeutung, um einen ausreichenden Schutz vor unerwünschten Wirkungen, wie z. B. kardiovaskulären Effekten, zu gewährleisten.

Die Gewebsspezifität von Nateglinid ist an menschlichem Gewebe bisher noch nicht eindeutig belegt worden. Elektrophysiologische Studien an „Inside-out-Membranpatchen“ aus nativem tierischen Gewebe und rekonstituierten Kanaltypen aus tierischer sowie humaner cDNA lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Während Nateglinid in Untersuchungen von SUNAGA et al. (2001) SUR1/Kir6.2- und SUR2/Kir6.2-Kanäle mit ähnlicher Potenz hemmte, zeigte die Substanz in weiteren Studien hohe Selektivität für die K_{ATP} -Kanäle der B-Zelle des Pankreas (HU et al., 1999; CHACHIN et al., 2002). Die Affinität von Nateglinid für die Bindung an den Sulfonylharnstoffrezeptor wurde bislang nur für die SUR1-Isoform ermittelt. Die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Bindung von [3H]Glibenclamid variierten dabei zwischen 490 nM und 8 μ M (HU et al., 2000; SUNAGA et al., 2001).

2 ZIELE DER ARBEIT

- (1) K_{ATP} -Kanäle registrieren über Nukleotidbindungsstellen Änderungen der zytosolischen Konzentration von ADP und ATP und koppeln so den metabolischen Status an die zelluläre elektrische Aktivität. An rekombinanten SUR1/Kir6.2-Kanälen sollte der Mechanismus der Interaktion zwischen Nukleosiddi- und -triphosphaten genauer untersucht werden.
- (2) Der Polymorphismus E23K in der Kir6.2-Untereinheit reduziert die ATP-Empfindlichkeit und führt zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des K_{ATP} -Kanals. In Patch-Clamp-Untersuchungen sollte der Einfluss des Polymorphismus E23K auf die Regulation der Aktivität von pankreatischen K_{ATP} -Kanälen durch Nukleosiddiphosphate bestimmt werden.
- (3) Um den Einfluss des häufigen Polymorphismus E23K im Kir6.2 weitergehend zu analysieren, sollte ein Targeting-Vektor zur Erzeugung eines transgenen Mausmodells konstruiert werden.
- (4) Eine hohe B-Zell-Selektivität neuer Sulfonylharnstoff-Analoga könnte dazu beitragen, das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen zu reduzieren. Um die Gewebsspezifität von Nateglinid bewerten zu können, sollte die Affinität der Substanz für die Bindung an die humanen Isoformen des pankreatischen (SUR1), kardialen (SUR2A) und vaskulären (SUR2B) Sulfonylharnstoffrezeptors gemessen und mit der Potenz zur Hemmung rekonstituierter humaner pankreatischer (SUR1/Kir6.2), kardialer (SUR2A/Kir6.2) und vaskulärer (SUR2B/Kir6.2) Kanäle verglichen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeines

3.1.1 Chemikalien

In der Regel wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia Biotech Europe, Bernd Kraft, Carl Roth, Life Technologies, Merck, Roche Molecular Biochemicals, Sigma Aldrich Chemie.

Alle Chemikalien entsprachen mindestens der Qualität „pro analysi“ (p. a.), sofern erhältlich wurde der Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“ bzw. „für die Zellkultur“ verwendet. Zur Herstellung der Lösungen, Medien und Puffer wurden die Chemikalien den Anforderungen gemäß in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder unter Verwendung des Spritzenvorsatzes Filtropur S 0,2 (Porengröße 0,2 µm, #83 1826 001, Sartstedt) sterilfiltriert. Die pH-Einstellung erfolgte mit NaOH- sowie KOH- und HCl-Lösungen.

3.1.2 Restriktionsenzyme und Primer

Restriktionsendonukleasen wurden von den Herstellern MBI Fermentas, New England Biolabs (NEB) und Stratagene erworben. Oligonukleotid-Primer wurden als Auftragssynthese von der Fa. Roth bezogen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Einführung von Punktmutationen

Zielgerichtete Punktmutationen wurden mit Hilfe des "QuikChange™ Site-directed Mutagenesis" Verfahrens der Fa. Stratagene unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) erzeugt (für weitere Details s. UHDE, 2001).

3.2.1.1 *Verwendete Plasmide*

Die im „QuikChange™ Site-directed Mutagenesis" Verfahren eingesetzte komplementäre DNA (cDNA) der humanen und tierischen SUR- und Kir-Isoformen lag entweder im pECE-Vektor (humane Isoformen von SUR1, SUR2A, SUR2B sowie haSUR1) oder im

pCMV6c-Vektor (humaner Kir6.2) vor. Die cDNA des Kir6.2 der Maus (mKir6.2) befand sich im pcDNA3-Vektor (#V79020, Invitrogen) und die genomische DNA des Kir6.2 der Maus im pBluescript® II-KS-Vektor (#212207, Stratagene).⁴

3.2.1.2 Design der Oligonukleotid-Primer

Es wurden jeweils zwei zueinander komplementäre Oligonukleotid-Primer mit 25–40 Basen verwendet. Dabei lag das zu verändernde Basenpaar in der Mitte der Primer, d.h. zu beiden Seiten der Punktmutation in 3'-Richtung ("upstream") und in 5'-Richtung ("downstream") befanden sich 10–15 Basenpaare der korrekten Basensequenz, die komplementär zur Template-DNA waren (UHDE, 2001).

Die Schmelztemperatur der Oligonukleotid-Primer (T_m) betrug in allen Fällen $78 \pm 3^\circ\text{C}$ und wurde nach folgender Formel abgeschätzt:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) - 675/N - \%_{(\Delta P/T)}$$

$\%GC$ = prozentualer Anteil der Basen Guanin (G) und Cytosin (C) am gesamten Oligonukleotid-Primer

N = Länge des Oligonukleotid-Primers in Basenpaaren

$\%_{(\Delta P/T)}$ = prozentuale Abweichung der Oligonukleotid-Primersequenz (P) von der Template-Sequenz (T)

Die lyophilisierten PCR-Primer (Auftragssynthese, Roth) wurden nach Angabe des Syntheseprotokolls mit autoklaviertem, bidest. Wasser auf eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und nach Bedarf weiter verdünnt.

⁴ Den cDNAs sind – wenn vorhanden – die folgenden GenBank-Kennnummern zugeordnet: AH004854 (huSUR1), AH006105 (huSUR2A und huSUR2B), D50582 (huKir6.2) und BC052731 (mKir6.2).

E23K-Mutagenese-Primer 1:

5' – gag gac cct gca **aag** ccc agg tac cgt – 3'

E23K-Mutagenese-Primer 2:

5' – acg gta cct ggg **ctt** tgc agg gtc ctc – 3'

SacII-Mutagenese-Primer 1:

5' – gac cct gca aag **ccg cgg** tac cgt act cga g – 3'

SacII-Mutagenese-Primer 2:

5' – c tcg agt acg gta **ccg cgg** ctt tgc agg gtc – 3'

Abb. 6 *Mutagenese-Primer zur Einführung einer Punktmutation und einer stillen Mutation.*

Basen: a = Adenin, c = Cytosin, g = Guanin, t = Thymin. Die von den Punktmutationen betroffenen Basentriplets sind unterlegt dargestellt und die veränderten Basen fett hervorgehoben.

3.2.1.3 Ausführung der PCR

Der Ansatz der PCR erfolgte in 0,2-ml-PCR-Softtubes der Fa. Biozym Diagnostik (#711088) und enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl: 50 ng Template-DNA, jeweils 125 ng der komplementären Oligonukleotid-Primer (s. 3.2.1.2), 10 mM Kaliumchlorid, 10 mM Ammoniumsulfat, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM Magnesiumsulfat, 0,1 % Triton® X-100, 0,1 µg/µl nukleasefreies Rinderserumalbumin (BSA), 250 µM dNTP-Mischung (dATP, dTTP, dGTP und dCTP in einer Konzentration von jeweils 62,5 µM), bidest. Wasser (autoklaviert) und 2,5 Einheiten der PfuTurbo™ DNA-Polymerase.

Die PCRs wurden mit einem MWG Biotech Thermo Cycler Typ Primus 25 (TC2500) durchgeführt und umfassten jeweils 12 bis 18 Reaktionszyklen. Um die DNA zu denaturieren, wurde der PCR-Ansatz initial für 1 min auf 95 °C erwärmt und zu Beginn jedes weiteren Zyklus für 30 s auf 95 °C erhitzt. Um die Bindung der Primer an die Template-DNA zu ermöglichen, folgte dann ein einminütiges Intervall bei einer Temperatur von 55 bis 65 °C, je nach Lage des Schmelzpunktes der Oligonukleotid-Primer. An dem so entstandenen Stück doppelsträngiger DNA konnte die Polymerase ansetzen, um den gebundenen Primer zu verlängern, was sich bei einer Temperatur von 68 °C mit einer Synthesegeschwindigkeit von 1000 Basenpaaren je 2 min vollzog.

Nach Ablauf der PCR wurde der PCR-Ansatz mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (10 U) behandelt. *DpnI* schneidet die durch Bakterien Adenosin-methylierte Template-DNA und verhindert so ihre Transformation. Das PCR-Produkt dagegen wird durch *DpnI* nicht verdaut (s. auch UHDE, 2001).

3.2.1.4 Kontrolle des PCR-Produkts

Nach Beendigung der PCR wurden 15 µl des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel elektrophoretisch gegen einen Größenmarker aufgetrennt. Dazu wurde unter Erhitzen eine 1-prozentige Agaroselösung in TAE-Puffer (s. u.) hergestellt. Mit der auf 50 bis 60°C abgekühlten Lösung wurde das Gel direkt in der Gelkammer (Bio Rad Mini-Sub Cel GT) gegossen. Die Proben wurden mit Probenpuffer (s. u.; Endkonzentration: 10% [v/v]) versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 50 V (Bio Rad Power Pac 300) über 2 bis 3 Stunden. Das Gel wurde anschließend für 10min in ein Bad mit einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) eingelegt, um die DNA anzufärben und dann bei 312nm auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT-28 M) ausgewertet. War ein PCR-Produkt in der erwarteten Länge entstanden, wurde es in E.-Coli-XL1-Blue-Bakterien transformiert (Epicurian Coli® XL1-Blue Supercompetent cells, Stratagene) (s. auch 3.2.4.3).

Probenpuffer

0,25% [w/v] Xylencyanol, 0,25% [w/v] Bromphenolblau, 25g Ficoll® 400 und 10ml 0,5M EDTA wurden in bidest. Wasser zu 100ml gelöst und anschließend autoklaviert.

TAE-Puffer (50fach)

242g Tris, 57,1 ml Eisessig und 100ml 0,5M EDTA-Lösung wurden mit bidest. Wasser zu 1000ml aufgefüllt. (Zur Herstellung des gebrauchsfertigen TAE-Puffers wurden 20ml dieser Stammlösung mit bidest. Wasser zu 1000ml verdünnt.)

3.2.2 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Zu untersuchende DNA-Fragmente (cDNA oder genomische DNA) wurden in geeignete Vektoren eingeführt, die entweder eine ausreichende autonome Replikation des Vektors in einem Wirtsbakterium gewährleisten (z. B. Klonierungsvektor pBluescript® II KS) oder die Expression in Säugerzellen ermöglichen (z. B. Expressionsvektor pcDNA3). Dazu wurde der ausgewählte Vektor zunächst mit einem Restriktionsenzym oder zwei verschiedenen Restriktionsenzymen in einem Verdau über 60 bis 90min geöffnet und danach durch Inkubation mit alka-

MATERIAL UND METHODEN

lischer Phosphatase (CIP, New England Biolabs) dephosphoryliert, um das Auftreten von Religationsereignissen zu minimieren. Die Herstellung des einzuführenden DNA-Fragments („Insert“) erfolgte idealerweise unter denselben Bedingungen, wobei jedoch der Dephosphorylierungsschritt unterblieb. Überhängende Enden wurden bei Bedarf mit T4-DNA-Polymerase (Promega) geglättet. Zur Aufreinigung wurden sowohl der geöffnete Vektor als auch das Insert über Gel-Elektrophorese von unerwünschten DNA-Bruchstücken abgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert („QIAEX II Gel Extraction Kit“, Qiagen). Die aufgereinigten Fragmente wurden danach für die Ligation eingesetzt (s. 3.2.3).

3.2.3 Ligation

Zur Ligation wurden der geöffnete Vektor und das Insert in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:10 gemischt (maximal 200ng Gesamt-DNA pro 10µl-Ansatz), mit je 1,5U T4-DNA-Ligase und 1 µl T4-DNA-Ligase -Puffer (beides #M1 801, Promega) versetzt, mit autoklaviertem bidest. Wasser zu je 10µl aufgefüllt und inkubiert, bei überhängenden Enden („sticky ends“) vier bis acht Stunden bei 20°C, bei glatten Enden („blunt ends“) 20 Stunden bei 10°C. Zur Kontrolle der Religationshäufigkeit wurde eine Ligation des geöffneten Vektors ohne Zugabe des Inserts durchgeführt. Je 1,5 µl dieser Ligationsansätze wurden dann zur Transformation von je 50 µl kompetenten Bakterien (s. 3.2.4.2; ca. 10⁶ Bakterien/µl) verwendet.

3.2.4 Kultivierung und Transformation von Bakterien

(Beschreibung in Anlehnung an DÖRSCHNER [2000])

3.2.4.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli-Bakterien (*E. coli*) wurden unter Schütteln bei 37°C in LB-Medium (s. u.) kultiviert oder auf LB-Agarplatten (15g/l Agar-Agar) angezüchtet. Bei plasmid- bzw. cosmid-transformierten Stämmen mit Resistenzgen wurde das Medium mit einem geeignetem Antibiotikum versetzt. So wurde zur Kultivierung von plasmidtransformierten XL1-Blue-Bakterien LB-Medium (s. u.) mit Ampicillin (100µg/ml) und für die DH5αTM-Bakterien mit dem Cosmid Lawrist 7 ein LB-Medium (s. u.) mit Kanamycin (30µg/ml) verwendet.

Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml)

1 g Ampicillin wurde in 20ml bidest. Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C vor Licht geschützt gelagert.

MATERIAL UND METHODEN

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10g/l Select Pepton 140, 5g/l Hefeextrakt und 10g/l Natriumchlorid wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,0 mit NaOH) und autoklaviert.

3.2.4.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien erfolgte unter Verwendung von Polyethylenglycol (PEG-Methode). 5ml LB-Medium (s. 3.2.4.1) wurden mit E.-coli-Bakterien (Epicurian Coli® XL1-Blue Supercompetent cells, Stratagene) beimpft und diese über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (Innova 4300, New Brunswick Scientific) vermehrt. Am nächsten Morgen wurden 50ml Medium A (s. u.) mit 500µl Übernachtskultur beimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578nm 0,55 betrug (Spektral-Photometer Uvikon 932, Kontron Instruments). Anschließend wurde die Bakteriensuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 10min auf Eis inkubiert und 10min bei 4°C und 1500g zentrifugiert (Kühlzentrifuge GR 2022 mit Rotor AG 290.9, Jouan; 2900 Upm). Das Sediment wurde in 500µl eiskaltem Medium A resuspendiert. Nach Zusatz von 2,5ml Medium B wurde vorsichtig gemischt und die Bakteriensuspension zu je 100µl aliquotiert. Die kompetenten Bakterien wurden bei -70°C eingefroren und bis zu einem Jahr gelagert.

Medium A zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien

2,465g/l Magnesiumsulfat und 2g/l Glucose-Monohydrat wurden in 1000ml LB-Medium (s. 3.2.4.1) gelöst und sterilfiltriert.

Medium B zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien

36% [v/v] Glycerin (wasserfrei, reinst), 12% [m/v] Polyethylenglycol 8000 und 0,296% [m/v] Magnesiumsulfat wurden in LB-Medium (s. 3.1.4.1) gelöst und sterilfiltriert.

3.2.4.3 Durchführung der Transformation

100µl kompetente Bakterien (s. 3.2.4.2) wurden in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 2µl der Plasmid-DNA-Lösung (50µg/ml) wurde der Ansatz vorsichtig geschwenkt und zunächst 30min in ein Eisbad gestellt. Danach wurde die Lösung in einem Wasserbad für exakt 90s bei 42°C inkubiert und dann sofort 1 bis 2 min im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 900µl SOC-Medium (s. u.) wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C im

MATERIAL UND METHODEN

Wasserbad temperiert und die Lösung anschließend auf eine LB-Ampicillin-Agarplatte (s. 3.2.4.1) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert (Begasungsbrutschrank BB6220, Heraeus Instruments).

SOB-Medium

20g/l Select Pepton 140, 5g/l Hefeextrakt 0,5g/l Natriumchlorid wurden in bidest. Wasser gelöst, 1% [v/v] Kaliumchlorid-Lösung (0,25M; pH 7) zugesetzt, die Lösung mit 5M NaOH auf pH 7,0 eingestellt, auf das Endvolumen aufgefüllt und autoklaviert.

SOC-Medium

Nach dem Autoklavieren wurde dem auf 60°C abgekühlten SOB-Medium (s. o.) unter aseptischen Bedingungen eine sterilfiltrierte 1M Glucoselösung (Endkonzentration 2% [v/v]) zugesetzt.

3.2.4.4 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung von plasmid- oder cosmidtransformierten Bakterienklonen über längere Zeiträume wurden glycerinhaltige Dauerkulturen angelegt, in denen die Bakterien bei einer Lagerungstemperatur von -70°C ihre Vitalität behalten. Dazu wurden je 1400µl einer flüssigen Bakterienkultur in Ampicillin- oder Kanamycin-LB-Medium (s. 3.2.4.1) mit je 400µl sterilem Glycerin (wasserfrei, reinst; autoklaviert) gemischt und in sterilen Mikro-Schraubröhrchen von Sarstedt (2ml) bei -70°C gelagert. Zur Vermehrung wurde mit einer Impföse ein kleiner Teil der angetauten Glycerinkultur abgenommen, in ein geeignetes Kulturmedium überführt oder auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Dauerkultur wurde wieder eingefroren.

3.2.5 Isolierung von DNA

3.2.5.1 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) verwendet. Gemäß Anleitung wurden 10ml LB-Medium (s. 3.2.4.1) mit einem geeigneten Selektionsantibiotikum versetzt und anschließend mit einer transformierten Bakterienkolonie von einer Selektions-LB-Agarplatte beimpft. Diese Bakteriensuspension wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurden 8ml der Übernachtskultur in 4 Aliquote von je 2ml aufgeteilt, in 2-ml-Reaktionsgefäße (#72695, Sar-

stedt) überführt und die Bakterien abzentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus Instruments; 1 min, 13000Upm). Die Bakterienpellets wurden in einem Waschvorgang mit je 1 ml PBS (s. u.) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Danach wurden die 4 Pellets in 250 µl P1-Puffer (mit RNase) vereinigt und sorgfältig suspendiert, nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes vorsichtig durch Umdrehen vermischt und dann sofort 350 µl N3-Puffer ergänzt und der Ansatz erneut durchmischt.⁵ Durch Zentrifugieren (Biofuge 13, Heraeus Instruments; 10 min, 13000Upm) wurde das Präzipitat aus denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA, zellulären Bestandteilen und SDS von der unter diesen Bedingungen in Lösung verbleibenden Plasmid-DNA abgetrennt. Der dekantierte Überstand wurde auf eine QIAprep-Spin-Säule gegeben, diese in ein Sammelgefäß gesetzt und zentrifugiert (1 min, 13000Upm). Die restliche Flüssigkeit im Sammelgefäß wurde verworfen, die Säule anschließend mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und der überschüssige Waschpuffer durch wiederholtes Zentrifugieren entfernt (jeweils 1 min bei 13000Upm). Danach wurde die Säule in einem neuen 1,5-ml-Auffanggefäß (#301003, Ochs) platziert und die Plasmid-DNA mit 30 µl bidestilliertem Wasser, Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer: 10 mM Tris und 1 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl) oder EB-Puffer von der Säule eluiert, indem die Elutionslösung nach einer Einwirkzeit von 1 min abzentrifugiert wurde (2 min bei 13000Upm).

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA in mittlerem und großem Maßstab (100–500 µg) erfolgte analog mit dem Midi- oder Maxipräparationskit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

PBS (Phosphate-buffered saline)

8 g/l Natriumchlorid, 0,2 g/l Kaliumchlorid, 1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat und 0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat wurden in bidestilliertem Wasser gelöst (pH 7,4 mit HCl).

3.2.5.2 Isolierung von Cosmid-DNA

Bei der Isolierung der Cosmid-DNA wurde nach dem speziellen Protokoll für „very low-copy“ Plasmide (Qiagen Plasmid Midi bzw. Maxi Kit, Qiagen) vorgegangen.

⁵ Die Puffer P2, N3 und EB sind gebrauchsfertig im Kit enthalten, der Puffer P1 muss vor der erstmaligen Verwendung noch mit der vorgegebenen Menge an RNase versetzt und das PE-Puffer-Konzentrat gemäß Hersteller-vorschrift mit Ethanol (96–100 %) verdünnt werden.

3.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm photometrisch (Spektralphotometer Uvikon 932, Kontron Instruments) bestimmt und in der Regel eine Arbeitskonzentration von 1 µg/µl eingestellt.

3.2.6 Sequenzierung

Die genomische DNA und das Einbringen von Mutationen in genomische bzw. komplementäre DNA wurden durch Sequenzierungen analysiert und überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB (Göttingen) mit Hilfe von uns entworfener, spezieller Sequenzierprimer durchgeführt.

3.2.7 Identifizierung von Klonen mit speziellen DNA-Sequenzen

3.2.7.1 PCR-Screening

Das PCR-Screening wurde genutzt, um mittels geeigneter Primer Bakterienkolonien oder eukaryotische Zellen direkt auf das Vorkommen bestimmter DNA-Sequenzen oder Plasmidvektoren hin zu untersuchen. Nach einem Lysevorgang dienten dabei die aufgeschlossenen Zellen selbst als PCR-Substrat, ohne vorherige DNA-Präparation und Restriktionsanalyse. Auf diese Weise wurden ohne viel Aufwand und Kosten eine hohe Anzahl von Zellen oder Bakterienkolonien gleichzeitig überprüft.

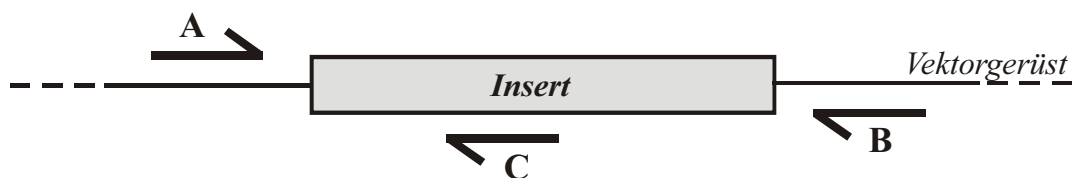


Abb. 7 Auswahl von Primern für das PCR-Screening.

Durch die Auswahl von speziellen Primern wurden das Vorkommen, die Größe (1–2kb) und zum Teil die Orientierung von Ziel-DNA-Sequenzen (Insert) in Plasmidvektoren nachgewiesen. Flankierende Primer (A und B) ergaben dabei ein Produkt mit definierter Größe und die Kombination aus einem flankierenden und einem spezifischen Primer für die Ziel-DNA-Sequenz (A und C) ließ einen Rückschluss auf die Orientierung des Inserts im Vektor zu.

MATERIAL UND METHODEN

Für das PCR-Screening auf den Kir6.2 der Maus (mKir6.2) fanden zwei Primer (A1 und A2) Anwendung, die sich jeweils am äußeren Ende des Inserts anlagerten. Beide Primer ergaben ein PCR-Produkt von 1148bp, sofern die gesuchte DNA-Sequenz vom mKir6.2 als Template im Ansatz vorhanden war.

A1 ($T_m = 60^\circ\text{C}$):

5' – ctg agg aat atg tgc tga cc – 3' [„Upstream“-Primer]

A2 ($T_m = 60^\circ\text{C}$):

5' – act cag gac aag gaa tct gg – 3' [„Downstream“-Primer]

Abb. 8 *Primer A1 und A2 für das PCR-Screening zum Nachweis mKir6.2-DNA.*

Basen: a = Adenin, c = Cytosin, g = Guanin, t = Thymin.

Zur Analyse von Bakterien wurde eine einzelne Kolonie mit einer Impföse von der Agarplatte gepickt, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß (#301003, Ochs) mit 20 µl bidest. Wasser überführt und gründlich dispergiert. Von diesem Ansatz wurden 10 µl zur Lyse verwendet und der Rest in 1 ml LB-Medium (s. 3.2.4.1) zur späteren Anzucht aufbewahrt. Das Lysieren der Bakterien und das PCR-Screening wurden in einem Thermocycler (Personal Cycler™20, Biometra) in 0,5-ml-PCR-Gefäßen (Multiply Pro 0,5 ml PCR-Gefäß, Sarstedt) nach folgenden Protokollen durchgeführt.

Lyseprotokoll:

<i>Zeitraum</i>	<i>Temperatur</i>
10min	95°C

Der PCR-Ansatz enthielt das gesamte Bakterienlysate (10 µl) oder 100 ng der gesuchten DNA-Sequenz als Positivkontrolle, 200 µM Desoxynukleosidtriphosphate (Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP; #200415, Stratagene), jeweils 500 nM von jedem Primer ($T_m \sim 60^\circ\text{C}$), 5 µl 10fach-Reaktionspuffer für SAWADY-Taq-DNA-Polymerase (Reaktionspuffer S, PEQLAB), 2,5 U SAWADY-Taq-DNA-Polymerase (#011030, PEQLAB) und bidest. Wasser in einem Gesamtvolumen von 50 µl.

PCR-Protokoll:

	<i>Zeitraum</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Prozess</i>
1x	5min	95°C	Initiale Denaturierung
┌	1 min	95°C	Denaturierung
30x	2min	T _a (meist ~55°C) ⁶	Primer-Anlagerung („Annealing“)
└	4min	72°C	Primer-Verlängerung („Elongation“)

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese (s. 3.2.1.4) kontrolliert, wobei 20µl des Gesamtvolumens zum Einsatz kamen.

3.2.7.2 Untersuchung genomischer Cosmid-Klone über DNA-Hybridisierung

Die Analyse der genomischen Cosmid-Klone wurde in Anlehnung an Standardmethoden (AUSUBEL et al., 2000) durchgeführt.

3.2.7.2.1 DNA-Auftrennung mittels Gel-Elektrophorese

Nach dem Verdau der Cosmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente auf einem speziellen Agarosegel elektrophoretisch gegen einen Größenmarker aufgetrennt. Dazu wurde unter Erhitzen zunächst eine 0,8%ige Lösung von SeaKem LE Agarose (#50001, BMA) in TAE-Puffer (s. 3.2.1.4) hergestellt und diese nach dem Abkühlen auf etwa 50 bis 60°C direkt in die Gelkammer (Scie-Pas H3-set) mit einem Kamm für 16 Geltaschen gegossen. Die Dicke der Gelschicht betrug 4 bis 7mm, um im Rahmen des folgenden Southern Blots einen optimalen DNA-Transfer zu ermöglichen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 10% [v/v] Probenpuffer (s. 3.2.1.4) versetzt, wobei die DNA-Konzentration pro Geltasche zwischen 200ng für Plasmid-DNA zur Positivkontrolle und 0,5 bis 10µg für Cosmid-DNA bzw. Proben aus genomischer DNA variierte. Die beiden äußeren Bahnen wurden zur Orientierung mit dem Größenmarker (#SMO0331, MBI Fermentas) belegt, da von ihnen beim Blot keine DNA auf die Membran übertragen werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25V (Bio Rad Power Pac 300) über Nacht (13h). Im Anschluss wurde das Gel für 10min in ein Bad mit einer Ethidiumbromidlösung

⁶ Annealingtemperatur T_a: 5°C unterhalb der Schmelztemperatur T_m der Primer

(0,5 µg/ml; #200271, Boehringer Mannheim) getaucht, um die DNA zu färben und danach unter Verwendung eines Lineals oder einer Linienschablone bei einer Wellenlänge von 312nm auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT-28M) ausgewertet, um später die Positionen der Banden identifizieren zu können.

3.2.7.2.2 Vorbehandlung des Gels für den Southern Blot

Zur Stabilisierung wurden die verbliebenen Geltaschen mit flüssiger Agaroselösung verschlossen. Im Folgenden wurde das Gel vor jedem neuen Schritt mit destilliertem Wasser abgespült:

- 1) Das Gel wurde in 1l einer 0,25M HCl-Lösung für ungefähr 30min bei Raumtemperatur leicht auf einer Wippe (Biometra W12) geschwenkt, wodurch die DNA teilweise depuriniert wurde und in kleinere Stücke zerbrach. Die genaue Zeitspanne hing von der Dicke des Gels ab und ließ sich am Umschlag der Farbmarker beurteilen. Nach dem Wechsel von Xylencyanol zu grün sowie Bromphenolblau zu gelb wurde das Gel noch für weitere 10min im Bad belassen.
- 2) Die Badlösung wurde gegen 1l Denaturierungslösung (1,5M Natriumchlorid und 0,5M Natriumhydroxid in Wasser) ausgetauscht, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen. Nach 20min wurde die Lösung erneuert und die Inkubation für weitere 20min fortgesetzt.
- 3) Um die DNA zu neutralisieren wurde Schritt 2 mit je 1l Neutralisierungslösung (1,5M Natriumchlorid und 0,5M Tris; pH 7,0 mit konz. HCl) wiederholt.

3.2.7.2.3 Southern Blot

Für den Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (#1417240, Roche) wurde ein Vakuum-Blotter (#21008100, Appligene; s. auch Abb. 9) verwendet, der den Transferpuffer 20fach-SSC⁷ (3M Natriumchlorid und 0,3M Natriumcitrat-Dihydrat; pH 7,0 mit HCl) bei einem Vakuum von 40–50mbar über 45–60min durch das Gel und die Membran saugt.

Nach dem Blotten wurde die Lage der Geltaschen mit einem Kugelschreiber auf die Membran übertragen und Gel sowie Membran aus dem Gerät entnommen. Verbliebene Gelreste wurden mit 2fach-SSC-Lösung abgespült und die Membran für 30min bei 80°C im Sterilisator (UT 6120, Heraeus Instruments) getrocknet. Um die DNA auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde diese in einem UV-Crosslinker (#22012501, Appligene) für 2min mit UV-

⁷ Aus der 20fach-SSC-Lösung wurden die übrigen aufgeführten Konzentrationen durch Verdünnen mit bidest. Wasser hergestellt.

Licht (254nm, 120mJ/cm²) bestrahlt. Bis zur Hybridisierung wurden die Membranen bei Raumtemperatur gelagert. Nach wiederholtem Färben des Gels im Ethidiumbromidbad wurde bei 312nm auf dem UV-Transilluminator (Herolab UVT-28M) die Vollständigkeit des DNA-Transfers kontrolliert.

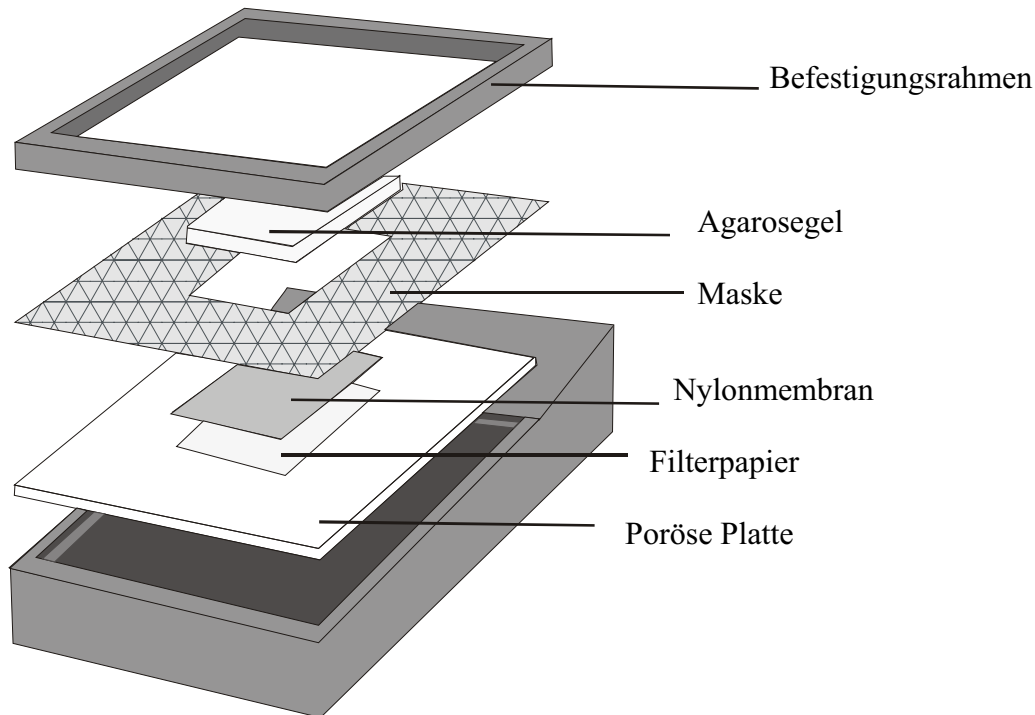


Abb. 9 *Aufbau des Blotters* (Abb. in Anlehnung an die Gebrauchsanweisung).

Die poröse Platte wurde zum Schutz der Nylonmembran faltenfrei mit Filterpapier abgedeckt. Das Filterpapier (#3030917, Whatman) wurde dann mit Transferpuffer befeuchtet und die Nylonmembran mittig unter der Öffnung in der Maske platziert. Als Letztes wurde das Gel auf das Fenster der Maske gelegt und der Aufbau mit Hilfe des Befestigungsrahmens gesichert. Auf die Geloberfläche wurden einige Milliliter Transferpuffer pipettiert, der während des Blotvorganges in Abständen ergänzt worden ist, so dass das Gel stets mit einer ausreichenden Flüssigkeitsschicht bedeckt war.

3.2.7.2.4 Herstellung des DNA-Sonden-Templates für den Kir6.2 der Maus

Die genomischen Cosmid-Klone wurden mit Hilfe der DNA-Hybridisierung auf das Vorhandensein des Gens Kir6.2 untersucht. Als Sonde stand die cDNA des Kir6.2 der Maus im pSV-Vektor (Promega) zur Verfügung. Um die lineare Sonde gezielt aus dem Plasmid isolieren zu können, wurde zunächst die direkte Umgebung jenseits von Start- bzw. Stopcodon sequenziert (s. 3.2.6).

“Upstream”-Primer: 5' – gcg caa gcg cag tgt gg – 3'

“Downstream”-Primer: 5' – cga gta cgg tac ctg gg – 3'

MATERIAL UND METHODEN

Mit Hilfe der Sequenzierung wurde eine günstig gelegene Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Sma*I 15bp vor dem Startcodon identifiziert. Da nach dem Stopcodon eine passende Schnittstelle fehlte, wurde nun über die Einführung einer „stillen“ Mutation mit dem "QuikChange™ Site-directed Mutagenesis"-Verfahren (s. 3.2.1) 21 bp nach dem Stopcodon eine neue Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Not*I (unterlegt dargestellt) in der cDNA des mKir6.2 generiert:

Wildtyp-Sequenz (1848–1883):

```
5'–gtt gca gtt cct cag gcc ccc act cac ttg tgt ggg–3'  
3'–caa cgt caa gga gtc cgg ggg tga gtg aac aca ccc–3'
```

Mutierte Sequenz (1848–1883):

```
5'–gtt gca gtt cct gcg gcc gcc act cac ttg tgt ggg–3'  
3'–caa cgt caa gga cgc cgg cgg tga gtg aac aca ccc–3'
```

Mutagenese-Primer 1:

```
5'–gtt gca gtt cct gcg gcc gcc act cac ttg tgt ggg–3'
```

Mutagenese-Primer 2:

```
5'–ccc aca caa gtg agt ggc ggc cgc agg aac tgc aac–3'8
```

Anschließend wurde die mKir6.2-cDNA in einem Doppelverdau mit den beiden Restriktionsenzymen *Sma*I und *Not*I aus dem Vektor herausgelöst und über eine Gel-Elektrophorese aufgereinigt. Die Bande mit dem gesuchten Fragment (1204bp) wurde unter UV-Licht (312nm; UV-Transilluminator Herolab UVT-28M) ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAEX-II-Gel-Extraktions-Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers mit TE-Puffer (10mM Tris und 1 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl) eluiert.

3.2.7.2.5 Herstellung und Reinigung radioaktiv markierter Sonden

Die radioaktiv markierten Sonden wurden direkt vor der Hybridisierung unter Verwendung des „Rediprime™ II Random Prime Labelling Systems“ (#1633, Amersham) hergestellt und mittels Säulenchromatographie über „MicroSpin™ G-50 Columns“ (#27-5330-01, Amersham) von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Das Reaktionsgefäß enthielt jeweils einen Reaktionspuffer mit einem Nukleotidgemisch aus dATP, dGTP sowie dTTP, das exo-

⁸ Basen: a = Adenin, c = Cytosin, g = Guanin, t = Thymin. Die von der Mutation betroffenen Basen sind fett hervorgehoben.

MATERIAL UND METHODEN

nukleasefreie Klenow-Fragment und Zufallshexamere („random primers“) als Primer in einer getrockneten, stabilisierten Form. Gemäß Anleitung wurde eine Lösung des DNA-Templates mit einer Konzentration von 12,5ng in 45 µl 10mM TE-Puffer (10mM Tris und 1 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl) vorbereitet, für 5min im kochenden Wasserbad auf 95–100 °C erhitzt und anschließend für 5min auf Eis abgekühlt, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren. Diese Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 µl Redivue-[³²P]-dCTP (AA0005-250 µCi, Amersham) hinzugefügt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig gemischt und für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zusatz von 5 µl 0,2M EDTA-Lösung gestoppt. Das Harz in den „MicroSpin™ G-50 Columns“ wurde durch Vortexen resuspendiert und der Aufbewahrungspuffer durch Zentrifugieren über 1min bei 3000Upm (Biofuge 13, Heraeus Instruments) entfernt. Die Reaktionsflüssigkeit mit der Sonde wurde mittig auf das Harzbett pipettiert und die Säule für weitere 2min zentrifugiert, wobei die gereinigte Lösung in einem neuen 1,5-ml-Reaktionsgefäß (#301003, Ochs) aufgefangen wurde. Vor Zugabe zur Hybridisierungslösung (s. 3.2.7.2.6) wurde die Sonde erneut durch Erhitzen im Wasserbad denaturiert.

3.2.7.2.6 Hybridisierung

Die Prähybridisierungslösung wurde gemischt und auf 68°C vorgewärmt. Eine Nylonmembran mit der immobilisierten DNA wurde in eine Hybridisierungsröhre (#052003, Biometra) geschoben und mit 6fach-SSC-Lösung (aus 20fach-SSC-Lösung: s. 3.2.7.2.3) angefeuchtet. Dann wurde die 6fach-SSC-Lösung abgegossen und durch 20ml Prähybridisierungslösung (s. u.) ersetzt. Durch die Prähybridisierung für 15min bei 68°C unter Rotation im Hybridisierungsinkubator APT-Line ES (#052601, Biometra) wurden die freien unspezifischen Bindungsstellen auf der Membranoberfläche blockiert. Nach dem Entfernen der Prähybridisierungslösung schloss sich der eigentliche Hybridisierungsvorgang an, indem sich die radioaktiv markierte, einzelsträngige DNA-Sonde an die komplementären Zielsequenzen der immobilisierten DNA anlagerte. 20ml Prähybridisierungslösung (s. u.) wurden mit der gesamten Lösung der radioaktiv markierten DNA-Sonde (s. 3.2.7.2.5) versetzt und zur Nylonmembran hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 68°C unter Rotation im Hybridisierungsofen über Nacht (~16h). Da die Sonde teilweise auch an DNA-Sequenzen bindet, die der Zielsequenz zwar ähnlich, aber nicht mit ihr identisch sind, wurden verschiedene Waschvorgänge vorgenommen, um die Spezifität nachträglich zu erhöhen. Dazu wurde die Hybridisierungslösung durch 20–40ml Waschlösung aus 2fach-SSC und 0,1%-SDS ersetzt und die

MATERIAL UND METHODEN

Röhre bei Raumtemperatur für 5min rotiert. Nach Austausch der alten Lösung gegen frische wurde der Vorgang für 5min fortgeführt. Die beiden beschriebenen Waschschrirte wurden danach noch einmal mit einer weniger konzentrierten Mischung (0,2fach-SSC/0,1%-SDS-Lösung) wiederholt. Zuletzt wurde die Membran mit 2fach-SSC abgespült, der Röhre entnommen und zum Schutz der Umgebung vor Kontamination in einer verschlossenen Plastiktüte aufbewahrt.

100fach-Denhardt-Lösung

20g/l Ficoll[®] 400, 20g PVP und 20g BSA wurden in bidest. Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 25-ml-Aliquoten bei -20°C gelagert.

Einzelsträngige Lachssperma-DNA-Lösung

250mg „Salmon-sperm“-DNA (#D1626, Sigma) wurde in 25ml bidest. Wasser gelöst, autoklaviert und in Aliquoten von 1ml bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lösung aufgetaut, für 10min im kochenden Wasserbad erhitzt und auf Eis abgekühlt.

Prähybridisierungslösung/Hybridisierungslösung

23,6ml bidest. Wasser, 10ml 20fach-SSC-Lösung (3M Natriumchlorid und 0,3M Natriumcitrat-Dihydrat; pH 7,0 mit HCl), 4ml 10%ige SDS-Lösung, 2ml 100fach-Denhardt-Lösung (s. o.) sowie frisch denaturierte einzelsträngige Lachssperma-DNA-Lösung (s. o.) wurden sorgfältig gemischt.

Die Hybridisierungslösung bestand aus der Prähybridisierungslösung einschließlich der zugefügten radioaktiv markierten Sonde (s. 3.2.7.2.5).

3.2.7.2.7 Nachweis der markierten DNA-Banden

Die Position der Membran in der Aufbewahrungstüte wurde im Hinblick auf die spätere Auswertung mit Leuchtfarbe gekennzeichnet und beides hiernach für die Autoradiographie zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm[™] MP, RPN36, Amersham) in eine Filmkassette (RPN12642, Amersham) gelegt. Die Expositionszeit bei -70°C betrug entweder 6–8h oder 14–16h. Nachdem die Kassette sich wieder auf Raumtemperatur erwärmt hatte, wurde der Film herausgeholt und entwickelt. Dafür wurde der Film ~2,5min lang in ein Bad mit Entwickler (s. u.) und anschließend für weitere 10min in den Fixierer (s. u.) getaucht. Danach wurde der Film 15min mit Leitungswasser gespült und an der Luft getrocknet. Auf dem entwickelten Film wurden anhand der Markierungen die Positionen der Gelkammern eingezeichnet und die Auswertung mit Hilfe des Lineals bzw. der Linienschablone vorgenommen.

Entwickler

Das SW-Entwicklerkonzentrat Dokumol (#100272, Tetenal) wurde nach Herstellerangaben für die Entwicklung von Filmen mit Wasser im Verhältnis 1:6 verdünnt.

Fixierer

Das Fixiererkonzentrat Superfix (#100474, Tetenal) wurde gemäß Herstellerangabe mit Wasser im Verhältnis 1:8 verdünnt.

3.2.8 Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung von COS-Zellen

(Beschreibung in Anlehnung an GROSS [2000])

3.2.8.1 Kultivierung von COS1- bzw. COS7-Zellen

COS1- und COS7-Zellen (CV-1, *Origin of SV40*; GLUZMAN, 1981) sind Derivate einer mit SV40-Viren (*Simian Virus*) infizierten permanenten Nierenzelllinie der afrikanischen Grünen Meerkatze (CV-1). Beide Zelllinien sind genetisch identisch und unterscheiden sich lediglich durch die Häufigkeit der Passagierung. Die als „Monolayer“ wachsenden Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-Medium mit 10% FKS (s. u.) kultiviert und im Abstand von 3–4 Tagen passagiert. Alle Arbeitsschritte, bei denen Sterilität gewährleistet sein musste, wurden an Sicherheitswerkbänken (Hera Safe HS12, Heraeus) durchgeführt. Medien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert.

Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) + 10% FKS (Kulturmedium)

13,5g/l DMEM-Trockenmedium (#T043-10, Biochrom) sowie 26mM Natriumhydrogencarbonat wurden in bidest. Wasser gelöst und mit Penicillin/Streptomycin-Stamm-lösung (Endkonzentration 100IE/ml Penicillin bzw. 100µg/ml Streptomycin) ergänzt (pH 7,15 mit HCl oder NaOH). Die Lösung wurde anschließend unter Verwendung eines Edelstahl-Vakuum-Filtrationsgeräts (#SM16268 107500, Sartorius) mit Vorfilter (#13400-130K, Sartorius) und Hauptfilter (0,2µm; #11307-142, Sartorius) sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C über maximal 8 Wochen. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden 10% [v/v] fötales Kälberserum (FKS; sterilfiltriert, Kraeber GmbH & Co; 30min bei 56°C hitzeinaktiviert) zugesetzt.

Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (20000IE/ml bzw. 20000µg/ml)

1,2g Penicillin G-Natrium (#A 321-42, Biochrom) und 2,0g Streptomycinsulfat (#A331-26, Biochrom) wurden in 100ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gelöst und bei -20°C gelagert.

3.2.8.2 Umsetzen der Zellen (Passagieren)

Die am Boden der Petrischale haftenden Zellen wurden je zweimal mit 8ml sterilem CMF-PBS (s. u.) gespült. Danach wurden die Zellen durch eine 2- bis 5-minütige Inkubation bei 37°C in 3ml Trypsin/EDTA-Lösung (#L-2153, Biochrom: Verdünnung im Verhältnis 1:10 mit bidest. Wasser) abgelöst, wobei die Reaktion nach Ablauf der Einwirkzeit durch Zugabe von 6ml DMEM mit 10% FKS (s. 3.2.8.1) gestoppt wurde, um eine Schädigung der Zellmembranen zu verhindern. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (5min bei 100g und 4°C, Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 2705, 900Upm) sowie der Bestimmung ihrer Anzahl wurden sie in frischem Kulturmedium resuspendiert und so auf vier neue Petrischälchen verteilt, dass sich ca. 1 Million Zellen pro Schale (10ml Zellsuspension) ergaben.

Phosphatpuffer (CMF-PBS)

8,0g/l Natriumchlorid, 0,2g/l Kaliumchlorid, 1,15g/l wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat und 0,2g/l Kaliumdihydrogenphosphat wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,3; autoklaviert).

3.2.8.3 Kryokonservierung von COS-Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen einer dicht bewachsenen Kulturschale (wie unter 3.2.8.2 beschrieben) abgedaut und sedimentiert. Anschließend wurden sie in 1,5ml Einfriermedium (DMEM mit 20% [v/v] FKS; Raumtemperatur; s. auch 3.2.8.1) resuspendiert und mit 1,5ml 10%iger DMSO-Lösung (Einfriermedium mit 10% [v/v] autoklaviertem DMSO) versetzt. Je 1,5ml dieser Suspension wurden in ein autoklaviertes Kryoröhrchen pipettiert und für 30min bei Raumtemperatur äquilibriert. Danach wurden die Kryoröhrchen in eine mit 100-prozentigem Isopropanol (p. a., #59301, Fluka) gefüllte Einfrierbox („Mr. Frosty“, #NA5100-0001, Nunc) gestellt und für mindestens 4 Stunden bei -70°C gelagert. Hinterher wurden sie tiefgefroren in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

3.2.9 Transfektion

(Beschreibung in Anlehnung an DÖRSCHNER [2000], GROSS [2000], UHDE [2001] und MEYER [2002])

3.2.9.1 *Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode*

Die transiente Transfektion der COS1- bzw. COS7-Zellen (s. 3.2.8.1) wurde mit einer modifizierten DEAE-Dextran-Methode durchgeführt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 200000 COS-Zellen für Patch-Clamp-Experimente bzw. 500000 COS-Zellen für Bindungsexperimente in 94-mm-Petrischalen in Kulturmedium (s. 3.2.8.1) ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Transfektion folgendermaßen durchgeführt: Für Patch-Clamp-Experimente wurden pro Schale 20 µg SUR-Plasmid mit 20 µg Kir6.2-Plasmid gemischt und mit TBS (s. u.) auf ein Gesamtvolumen von 60 µl ergänzt, während für Bindungsexperimente 20 µg SUR-Plasmid mit TBS (s. u.) auf 60 µl verdünnt wurden. Die weiteren Schritte des Transfektionsverfahrens verliefen für beide Experimente analog. Dem Gemisch wurde 120 µl mit TBS (s. u.) verdünntes DEAE-Dextran (83,6 µl einer Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg Diethylaminoethyl-Dextran [Sigma] pro ml; autoklaviert) zugesetzt und nach gründlichem Mischen bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Dann wurde das DNA/DEAE-Dextran-Gemisch mit 4 ml einer frisch hergestellten FKS-Lösung in TBS (Endkonzentration 10% [v/v]) verdünnt, vorsichtig durchmischt und auf die zuvor zweimal mit je 8 ml HBSS (s. u.) gewaschenen Zellen pipettiert. Danach wurden die Platten vier Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ (Begasungsbrutschrank BB6220, Heraeus Instruments) inkubiert. Anschließend wurde die DNA/DEAE-Dextran-Lösung abgesaugt und durch 5 ml einer frisch hergestellten, vortemperierten DMSO-Lösung (10% [v/v] DMSO in HBSS) ersetzt. Nach genau zweiminütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt und 10 ml frisch hergestelltes Chloroquin-Medium (s. u.) zugegeben. Die Platten wurden dann vier Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 8 ml HBSS (s. u.) gewaschen und 12 ml Kulturmedium (DMEM mit 10% FKS) zugesetzt. Nach 48–72 Stunden konnten die Zellen für Patch-Clamp-Experimente verwendet werden. Die Herstellung der Membranpräparationen (s. 3.3.1) für die Bindungsexperimente erfolgte nach 72 Stunden.

Chloroquin-Medium: DMEM mit 100 µM Chloroquin und 2% FKS-Medium

Pro Platte wurden 200 µl FKS, 100 µl Chloroquin-Stammlösung und 9,7 ml DMEM-Medium (s. auch 3.2.8.1; ohne FKS, Penicillin und Streptomycin) gemischt.

MATERIAL UND METHODEN

Chloroquin-Stammlösung

51,6mg Chloroquin (#C6628, Sigma) wurden in 9,22ml bidest. Wasser gelöst und mit 0,5ml 1 M Tris-Puffer (pH 7,4; autoklaviert) und 0,28ml 5 M Natriumchlorid-Lösung vermischt. Anschließend wurde diese Lösung unter Verwendung eines Edelstahl-Vakuum-Filtrationsgeräts (#SM16268107500, Sartorius) mit Vorfilter (#13400-130K, Sartorius) und Hauptfilter (0,2µm; #11307-142, Sartorius) sterilfiltriert und in Aliquoten bei -20°C vor Licht geschützt gelagert.

HBSS-Puffer („Hepes Buffered Saline Solution“)

8g/l Natriumchlorid, 0,37g/l Kaliumchlorid, 107,7mg/l wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat und 5g/l HEPES wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,05). Anschließend wurde die Lösung unter Verwendung eines Edelstahl-Vakuum-Filtrationsgeräts (#SM16268107500, Sartorius) mit Vorfilter (#13400-130K, Sartorius) und Hauptfilter (0,2µm; #11307-142, Sartorius) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

TBS-Puffer („Tris Buffered Saline“)

Lösung A: 80g/l Natriumchlorid, 3,8g/l Kaliumchlorid, 2,0g/l wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat und 30g/l Tris wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,5).

Lösung B: 1,5% (m/v) Calciumchlorid und 1,0% (m/v) Magnesiumchlorid wurden in bidest. Wasser gelöst.

Zur Herstellung des TBS-Puffers wurden 100ml Lösung A mit 890ml bidest. Wasser vermischt und 10ml Lösung B tropfenweise unter Rühren zugegeben. Danach wurde der Puffer unter Verwendung eines Edelstahl-Vakuum-Filtrationsgeräts (#SM16268107500, Sartorius) mit Vorfilter (#13400-130K, Sartorius) und Hauptfilter (0,2µm; #11307-142, Sartorius) sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

3.2.9.2 Kotransfektion von SUR1 und zwei Kir6.2-Isoformen im Verhältnis 1:1 und 1:10

20µg SUR1-Plasmid wurden mit 10µg Kir6.2_{wt}-Plasmid und 10µg Kir6.2_{G334D}-Plasmid oder mit 10µg Kir6.2_{G334D-C166S}-Plasmid (im Verhältnis 1:1) gemischt und wie unter 3.2.9.1 beschrieben weiter verarbeitet. Für die Kotransfektion von SUR1 mit Kir6.2-Isoformen im Verhältnis 1:10 wurden 20µg SUR1-Plasmid mit 2µg Kir6.2_{wt}-Plasmid und 18µg Kir6.2_{G334D}-Plasmid gemischt und wie unter 3.2.9.1 beschrieben weiterbearbeitet.

3.2.9.3 Histologische LacZ-Färbung

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz diente die histologische LacZ-Färbung. Bei jeder Transfektion wurde eine Petrischale mit β -Galactosidase-Plasmid transfiziert. Das codierte Enzym β -Galaktosidase setzt nach seiner Expression die farblose Verbindung X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid) zu einem blauen Farbstoff um.

3.2.9.3.1 Färbung

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit CMF-PBS (s. 3.2.8.2) gewaschen und mit 5 ml 3%igem [w/v] Paraformaldehyd in CMF-PBS (pH 7,4) versehen. Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden sie erneut zweimal mit CMF-PBS (s. 3.2.8.2) gewaschen, mit 5 ml 0,2%igem Triton[®]X-100 in CMF-PBS (#789704, Boehringer Mannheim) versetzt und alles 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit CMF-PBS (s. 3.2.8.2) gewaschen und die frisch zubereitete Färbelösung (s. u.) zugegeben. Die letzte Inkubation erfolgte über 24 Stunden bei 37°C in Dunkelheit. Danach wurden die Zellen zweimal mit CMF-PBS (s. 3.2.8.2) gewaschen und das Resultat ausgewertet.

Färbelösung

100 μ l 0,5 M Kaliumferrocyanatlösung, 100 μ l 0,5 M Kaliumferricyanatlösung, 1 ml X-Gal (#23153, Roth; 10 mg/ml in Dimethylformamid) und 10 μ l 2 M Magnesiumchloridlösung wurden ad 10 ml in bidest. Wasser gelöst.

3.2.9.3.2 Auswertung der Färbung

Die Auswertung der Färbung erfolgte unter dem Mikroskop. Transfizierte Zellen erscheinen nach der Färbung blau. Die Transfektionseffizienz wurde ermittelt als der Anteil der blau gefärbten Zellen an der gesamten Zellmenge.

3.3 Gleichgewichtsbindungsexperimente an COS-Membranen

(Beschreibung in Anlehnung an SIEVERDING [1998] und DÖRSCHNER [2000])

3.3.1 Präparation von Membranen aus COS-Zellen

72 Stunden nach der Transfektion (s. 3.2.9.1) wurde das Kulturmedium aus den Kulturschalen entfernt und der Zellrasen mit 5 ml Phosphat-Spülpuffer (s. u.) gespült. Anschließend wurden die Zellen nach Zusatz von 3 ml Phosphat-Spülpuffer (s. u.) mit einem Gummischaber vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in Spitzbodenröhrchen überführt und jede Kulturschale zweimal mit 2 ml Spülpuffer (s. u.) nachgespült. Danach wurden die Zellen 5 min bei 100g sedimentiert (4°C, Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 2705, 900Upm), in jeweils 500µl kaltem Lysemedium (4°C; s. u.) resuspendiert, in einen 1-ml-Glashomogenisator (Nr. 19, Kontes Glass Co, Vineland, NJ, USA) überführt und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde 30min auf Eis inkubiert, um die Zellen in dem hypotonen Medium platzen zu lassen. Hinterher wurde die Suspension unter Eiskühlung mit 40 Hüben (Teflonpistill) bei 500Upm mechanisch homogenisiert. Zur Sedimentation der Zellfragmente wurde dieses Homogenisat 30min bei 4°C und 38000g zentrifugiert (Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor 2.20, Jouan). Das Sediment wurde in je 100µl kaltem Homogenisationspuffer (s. u.) resuspendiert, unter Verwendung des Glashomogenisators (s. o.) rehomogenisiert und erneut sedimentiert (1h, 38000g; Kühlzentrifuge Jouan). Dieses zweite Sediment mit den fragmentierten Membranen der Zellen wurde in jeweils 60µl kaltem 5mM Tris-Puffer (pH 7,4 mit HCl) resuspendiert. Nach Rehomogenisation mit dem Glashomogenisator (s. o.) wurde die Suspension in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

Homogenisationsmedium (50mM Tris, 0,1 mM PMSF, pH 7,4)

303mg Tris wurden in 40ml bidest. Wasser gelöst und 50µl ethanolische PMSF-Lösung (100mM; s. Lysemedium) hinzugefügt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser auf 50ml abgeglichen (pH 7,4 mit HCl).

Lysemedium (5mM Tris, 0,1 mM PMSF, pH 8,0)

Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine ethanolische PMSF-Lösung (100mM) hergestellt. Dazu wurden 8,71mg Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in 500µl 99,9%igem Ethanol gelöst. Dann wurden 60,5mg Tris in 90ml bidest. Wasser gegeben und 100µl der ethanolischen PMSF-Lösung (100 mM) ergänzt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser auf 100ml abgeglichen (pH 8,0 mit HCl).

MATERIAL UND METHODEN

Phosphat-Spülpuffer (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 6,5mM Na₂HPO₄, 0,5mM MgCl₂, 0,7mM CaCl₂)

8g/l Natriumchlorid, 0,2g/l Kaliumchlorid, 1,15g/l wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat, 0,1g/l Magnesiumchlorid und 0,1g/l Calciumchlorid wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,4 mit HCl).

3.3.2 Durchführung der Proteinbestimmung

(abgewandelt nach Sigma, Methode Nr. TPRO-562)

Für die Eichreihe wurde der Proteinstandard (1mg/ml Bovines Serum Albumin; Serva) so verdünnt, dass die Lösungen 0, 200, 400, 600, 800 und 1000µg BSA/ml enthielten. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte in einer Mikrotiterplatte (#821581, Sarstedt). Pro Inkubationsansatz wurden zu 200µl von der Lösung A (s. u.) jeweils 10µl verdünnte Proteinstandardlösung bzw. Probelösung gegeben und 30min bei 37°C unter Schütteln inkubiert (Inkubator SLT, Typ IS 2.10). Anschließend wurden die Proben 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 550nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (SLT, Modell 340 ATTC) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Easy-Fit“-Programms (Version 5.47, SLT).

Lösung A:

5ml Bicinchoninsäure-Lösung (Sigma) und 0,1ml 4%ige [w/v] Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat-Lösung (Merck) gut vermischen.

3.3.3 Herstellung der Lösungen

3.3.3.1 Lösungen der Radioliganden

[³H]Glibenclamid-Stammlösung (3nM; spezifische Aktivität: 51,4Ci/mmol)

4µl [³H]Glibenclamid (250µCi/250µl, NET 1024, DuPont NEN Products) wurden mit 40ml Tris-Puffer (50mM; pH 7,4 mit HCl) vermischt. Die Konzentration von [³H]Glibenclamid wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert, wenn die Abweichung vom Sollwert (33840dpm/100µl) mehr als 5% betrug.

[³H]P1075-Stammlösung (30nM; spezifische Aktivität: 121 Ci/mmol)

360 µl [³H]P1075 (250 µCi/5000 µl, TRK949, Amersham) wurden mit 4640 µl Tris-Puffer (50 mM; pH 7,4 mit HCl) vermischt. Die Konzentration von [³H]P1075 wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung kontrolliert und korrigiert, wenn die Abweichung vom Sollwert (79920 dpm/10 µl) größer als 5 % war.

3.3.3.2 Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen

Von jedem verdrängenden Liganden wurde eine Stammlösung in einem geeigneten Lösungsmittel angesetzt, bei -20 °C eingefroren und gelagert. Für die Bindungsexperimente wurden aus diesen Stammlösungen durch stufenweise Verdünnung mit Tris-Puffer (50 mM; pH 7,4 mit HCl) Lösungen mit der jeweils benötigten Substanzkonzentration hergestellt.

Glibenclamid-Stammlösung (1 mM)

4,94 mg Glibenclamid (Hoechst; MG 493) wurden unter Rühren in 10 ml NaOH (50 mM) über Nacht bei 37 °C gelöst.

Pinacidil-Stammlösung (20 mM)

5,26 mg Pinacidil-Monohydrat (Leo Pharmaceutical Products; MG 263,4) wurden in 1 ml HCl (25 mM) gelöst. Diese Stammlösung konnte 1:20 mit Tris-Puffer (50 mM; pH 7,4 mit HCl) verdünnt werden, ohne dass Pinacidil ausfiel. Der pH-Wert der Pinacidil-Lösung (1 mM) betrug 7,35 bis 7,40.

Nateglinid-Stammlösung (30 mM)

9,52 mg Nateglinid (Novartis; MG 317,4) wurden in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Nach Verdünnung der Stammlösung für die Bindungsexperimente lag die Endkonzentration von Dimethylsulfoxid in den jeweiligen Prüflösungen unter 1 %.

3.3.4 Filtrationsassay

Die Vakuumfiltration ist ein verbreitetes Verfahren zur Trennung von freien und gebundenen Liganden bei Radioligandbindungsstudien (BENNETT, 1978; REPKE und LIEBMANN, 1987). Der Radioligand-Rezeptor-Komplex ist während der Vakuumfiltration allerdings über einen kurzen Zeitraum einem radioligandfreien Waschpuffer ausgesetzt. Daher wird dieses Verfahren nur für solche Radioligand-Rezeptor-Komplexe empfohlen, deren Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich liegen (REPKE und LIEBMANN, 1987).

3.3.4.1 Vorbereitung der Membranen

Ein Aliquot der bei -70°C aufbewahrten Membranen (s. 3.3.1) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, in Tris-Puffer (50mM; pH 7,40 mit HCl) resuspendiert, in ein 0,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 8–10 mal für je eine Sekunde unter Eiskühlung extern beschallt (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company; „output control“: Stufe 7, „duty cycle“ 25%, nicht gepulst; Ausrüstung: Standard-Resonator). Die Membransuspension wurde mit Tris-Puffer (50mM; pH 7,40 mit HCl) auf das erforderliche Volumen verdünnt.

3.3.4.2 Inkubationen

Alle Inkubationen wurden standardmäßig bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt.

A) Bindung von [^3H]Glibenclamid an SUR1: Das Inkubationsmedium enthielt 0,3nM [^3H]Glibenclamid, 0,7mM Magnesiumchlorid sowie resuspendierte Membranen mit einer Endkonzentration an mikrosomalem Protein von etwa 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubation von Ansätzen mit zusätzlich 100nM unmarkiertem Glibenclamid bestimmt. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung ermittelt.

Die Durchführung der Inkubationen erfolgte in 2-ml-Reaktionsgefäßen ohne Deckel (Sarstedt) bei Raumtemperatur. Die Endkonzentrationen der zugesetzten Testsubstanzen sind im Ergebnisteil angegeben, sie wurden durch Zusatz von Aliquoten der Stammlösungen (s. 3.3.3.2) zum Inkubationsmedium eingestellt. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von mikrosomalem Protein gestartet und nach 60min durch Filtration (s. 3.3.4.3) beendet.

B) Bindung von [^3H]P1075 an SUR2-Isoformen: Das Inkubationsmedium enthielt 3nM [^3H]P1075, 0,1mM ATP und resuspendierte Membranen mit einer Endkonzentration an mikrosomalem Protein von 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die freie Mg^{2+} -Konzentration von 0,7mM wurde mit Magnesiumchloridlösung (1mM Magnesiumchlorid in 50mM Tris-Puffer; pH 7,4 mit HCl) eingestellt. Durch parallele Inkubation von Ansätzen mit einem Zusatz von 100 μM unmarkiertem Pinacidil wurde die unspezifische Bindung bestimmt. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung berechnet. Alle Inkubationen fanden in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen ohne Deckel bei Raumtemperatur statt. Für weitere Details siehe 3.3.4.2A.

3.3.4.3 *Filtration und Szintillationszählung*

Die Filtrationsapparatur bestand aus einer 2-l-Saugflasche mit einem Membranfilteraufsatz für Filter mit einem Durchmesser von 25mm. Die Saugflasche war an eine Vakuumpumpe (Vacuubrand) angeschlossen. Bei der Filtration kamen Glasfaserfilter (Whatman GF/B, 25mm Durchmesser) zum Einsatz, die vor der Verwendung für 15 min bei 4°C in Tris-Puffer (50mM; pH 7,4 mit HCl) eingelegt wurden. Das Inkubationsgemisch eines Ansatzes (1ml bzw. 500µl) wurde auf das Filter pipettiert und dieses dreimal mit je 4ml Tris-Puffer (50mM; pH 7,4 mit HCl; 4°C) gespült. Nach dem Spülvorgang wurde das Filter in ein Zählgefäß (Mini Vial C; Roth) überführt. Der [³H]-Gehalt der Filter wurde nach Zugabe von 4ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe™ Plus, Lumac * LSC B.V., Niederlande) und 24-stündiger Äquilibrierung bei Raumtemperatur in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2100 TR, Canberra-Packard) ermittelt.

3.4 Elektrophysiologische Registrierungen

(Beschreibung nach GROSS [2000], MARKWORTH [2001] und MEYER [2002])

3.4.1 Lösungen

3.4.1.1 *Basislösungen*

Extrazelluläre Lösung (EZ)

140mM Natriumchlorid, 5,6mM Kaliumchlorid, 1,2mM Magnesiumchlorid, 2,6mM Calciumchlorid und 10mM HEPES wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,4 mit NaOH).

Intrazelluläre Lösung (IZ) mit 1,0mM MgCl₂

140mM Kaliumchlorid, 1mM Magnesiumchlorid, 2mM Calciumchlorid, 10mM EGTA und 5mM HEPES wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,3 mit KOH, soweit nicht anders angeben).

Pipettenlösung

2,6mM Calciumchlorid, 10mM HEPES, 146mM Kaliumchlorid und 1,2mM Magnesiumchlorid wurden in bidest. Wasser gelöst (pH 7,4 mit KOH) und die Lösung maximal drei Monate bei 4°C aufbewahrt.

3.4.1.2 Lösungen der eingesetzten Nukleotide

Die freie Mg^{2+} -Konzentration in den Nukleotidlösungen wurde bei etwa 0,7mM gehalten. Dafür wurde die zur Einstellung dieser Endkonzentration erforderliche Menge an Mg^{2+} -Ionen mit Hilfe eines Computerprogramms errechnet (FABIATO, 1988) und in Form einer Magnesiumchloridlösung (1mM) ergänzt. Die im Ergebnisteil angegebenen Nukleotidkonzentrationen in den jeweiligen Versuchsansätzen wurden durch Verdünnung der jeweiligen Ausgangslösungen (s. u.) mit intrazellulärer Lösung (mit 1 mM MgCl_2 ; s. 3.4.1.1) bzw. mit der zur Herstellung verwendeten Nukleotidlösung angefertigt. Die verwendeten Lösungen wurden täglich frisch hergestellt und der pH-Wert auf 7,3 abgeglichen.

ADP-Lösung (0,3 mM)

22,56mg ADP (Boehringer; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2\text{Kx}2\text{H}_2\text{O}$; MG 501,3) wurden in 150ml IZ gelöst.

AMP-PNP-Lösung (3 mM)

15,9mg AMP-PNP (Boehringer; $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{P}_3\text{Li}_4$; MG 529,9) wurden unter Zusatz von 26 μl Magnesiumchloridlösung (1 mM) entweder in 10ml IZ oder in 10ml einer 3mM GDP-Lösung gelöst.

ATP-Lösung (10 mM)

60,52mg ATP (Roche; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2\text{x}3\text{H}_2\text{O}$; MG 605,2) wurden unter Zusatz von 85 μl Magnesiumchloridlösung (1 mM) in 10ml IZ oder bei Bedarf in 10ml einer anderen Nukleotidlösung gelöst.

ATP γ S-Lösung (3 mM)

16,41 mg ATP γ S (Boehringer; $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}_3\text{SLi}_4$; MG 547,0) wurden unter Zusatz von 26 μl Magnesiumchloridlösung (1 mM) entweder in 10ml IZ oder in 10ml einer 3mM GDP-Lösung gelöst.

dATP-Lösung (7 mM)

37,45mg dATP (Sigma; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{P}_3\text{Na}_2$; MG 535,2) wurden unter Zusatz von 32 μl Magnesiumchloridlösung (1 mM) entweder in 10ml IZ oder in 10 ml einer 3mM GDP-Lösung gelöst.

GDP-Lösung (10mM)

46,52mg GDP (Sigma; $C_{10}H_{14}N_5O_{11}P_2Na$; MG 456,2) wurden unter Zusatz von 47 μ l Magnesiumchloridlösung (1mM) in 10ml IZ oder bei Bedarf in 10ml einer anderen Nukleotidlösung gelöst.

UTP-Lösung (7mM)

41,03mg UTP (Sigma; $C_9H_{12}N_2O_{15}P_3Na_3$; MG 586,1) wurden unter Zusatz von 61 μ l Magnesiumchloridlösung (1mM) entweder in 10ml IZ oder in 10ml einer 3mM GDP-Lösung gelöst.

3.4.1.3 Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen

Von den einzelnen Testsubstanzen wurde eine Stammlösung in einem geeigneten Lösungsmittel angesetzt, aliquotiert und bei $-20^{\circ}C$ gelagert (soweit nicht anders angegeben). Aus diesen Stammlösungen wurde durch Verdünnung mit intrazellulärer Lösung (mit 1mM $MgCl_2$) oder den im Ergebnisteil aufgeführten Nukleotidlösungen (s. auch 3.4.1.2) die jeweils benötigte Testkonzentration hergestellt. Der pH-Wert wurde anschließend auf 7,3 eingestellt. Stammlösungen in DMSO wurden dabei so stark verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO in den Testlösungen maximal 1% betrug.

Glipizid-Stammlösung (10mM)

8,91mg Glipizid (Pfizer; MG 445,6) wurden in 2ml KOH (0,2M) gelöst.

Nateglinid-Stammlösung(30mM)

9,52mg Nateglinid (Novartis; MG 317,4) wurden in 1ml DMSO gelöst.

Tolbutamid-Stammlösung (50mM)

67,58mg Tolbutamid (Sigma; MG 270,3) wurden in 5ml KOH (0,2M) gelöst.

3.4.2 Vorbereitung der Zellen

48 Stunden nach der Transfektion (s. 3.2.9) wurden die Zellen wie unter 3.2.8.2 beschrieben so auf drei bis fünf kleine Petrischalen mit 35mm Durchmesser (Sarstedt) umgesetzt, dass die Zelldichte pro Schale ca. 50% betrug. Anschließend wurden die Schalen in den Brutschrank ($37^{\circ}C$ und 5% CO_2) zurückgestellt. Nach zwei Stunden waren die Zellen am Boden festgewachsen und wurden innerhalb der folgenden 48 Stunden für Patch-Clamp-Experimente verwendet.

3.4.3 Durchführung der elektrophysiologischen Experimente

Zur Registrierung der Ströme durch K_{ATP} -Kanäle wurde die „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik eingesetzt (HAMILL et al., 1981). Die Experimente wurden bei Raumtemperatur in 35-mm-Petrischalen unter Verwendung eines inversen Mikroskops (IM 35, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Petrischalen dienten zugleich als Badkammer. Sie wurden kontinuierlich mit intrazellulärer Lösung (s. 3.4.1.1) perfundiert (3 ml/min).

3.4.3.1 Herstellung der Pipetten

Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas (Außendurchmesser: 2mm; Wandstärke: 0,3mm) unter Verwendung eines vertikalen Pipettenziehgerätes (Patch Pipetten Puller PA-10, E.S.F. electronic, Göttingen) hergestellt und hitzepoliert, indem sie für 20s vor einen mit Glas überzogenen, erhitzten Platin-Iridium-Draht gehalten wurden. Die verwendeten Pipetten besaßen an der Spitze einen Durchmesser von ca. 1 μ m und wiesen nach Füllung mit Pipettenlösung (s. 3.4.1.1) Widerstände von ca. 5–8 M Ω auf.

3.4.3.2 Aufbau des Patch-Clamp-Setups

Die Patchpipette wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (MO-103N, Narishige, Tokio, Japan) unter optischer Kontrolle durch das Mikroskop präzise auf die Zellmembran aufgebracht. Zur Vermeidung von Erschütterungen wurden Mikroskop und Mikromanipulator auf einem schwingungsgedämpften Tisch (LT 100/80, Barry Controls, Raunheim) aufgebaut. Nach erfolgter Patchbildung wurden die Registrierungen unter Verwendung eines „LM-EPC7 Patch-Clamp-Verstärkers“ (List Electronic, Darmstadt) durchgeführt. Die Stromsignale wurden bei 2kHz mit einem 4-Pol-Besselfilter (LPBF-48DG, npf) Tiefpass gefiltert, mit einem A/D-Wandler digitalisiert (VR-10B; Instrutech, New York, USA) und auf einem Videoband gespeichert. Zur Auswertung wurden diese Daten mit 10kHz unter Einsatz eines „Digidata 1200 Interface Adapters“ (Axon Instruments, Foster City, USA) digitalisiert und mit Hilfe des Programms „pClamp 8.0.1“ (Axon Instruments, Foster City, USA) ausgewertet. Abbildungen der Registrierungen wurden unter Verwendung eines Schnellschreibers (Recorder 220, Gould, Cleveland, OH; USA) erstellt.

3.4.3.3 *Sealbildung und Patch-Clamp-Konfigurationen*

Zu Beginn eines Experiments wurde die Pipettenspitze in extrazelluläre Lösung (s. 3.4.1.1) getaucht und das Stromausgangssignal des Verstärkers auf Null abgeglichen. Das unter diesen Bedingungen beobachtete Potenzial diente bei allen Messungen als Referenzwert. Eine Korrektur für Übergangspotenziale wurde nicht vorgenommen. Die Pipettenspitze wurde mit Hilfe des Mikromanipulators unter Mikroskopkontrolle nahe an die Zelloberfläche herangebracht. Eine leichte Erhöhung des Pipettenwiderstands um ca. $5\text{M}\Omega$ zeigte einen Kontakt zur Zelloberfläche an. Durch vorsichtiges Ansaugen und Anlegen eines Pipettenpotenzials von -20mV konnten Abdichtungswiderstände zwischen Pipette und Zellmembran im Gigaohmbereich („Gigaseal“) erzielt werden. Die auf diese Weise erhaltene Konfiguration wird als „Cell-attached“-Konfiguration bezeichnet (s. Abb. 10). Zur Erzeugung eines „Inside-out“-Patches wurde die Pipette nach Austausch der extrazellulären Lösung im Bad gegen intrazelluläre Lösung (s. 3.4.1.1) langsam von der Zelle zurückgezogen, wodurch ein Membranstück aus der Zelle gelöst wurde, ohne dass sich das Seal deutlich veränderte. In dieser sog. „Inside-out“-Konfiguration ist die zytosolische Seite der Plasmamembran direkt der Badlösung zugewandt. In einigen Fällen schloss sich beim Abziehen das Membranstück an der Pipettenspitze zu einem Vesikel. In diesem Fall wurde die Pipette kurz aus dem Bad herausgezogen. Durch den Luftkontakt entstand dann häufig die gewünschte „Inside-out“-Konfiguration.

Alle Patch-Clamp-Experimente wurden in der „Inside-out“-Konfiguration bei einem Membranpotenzial von -50mV in Gegenwart einer hohen symmetrischen K^+ -Konzentration (um 140mM ; s. 3.4.1.1) auf beiden Seiten der Plasmamembran durchgeführt, d.h. es wurden Einwärtsströme gemessen. Die verwendeten Lösungen enthielten etwa $0,7\text{ mM}$ freies Magnesium (s. auch 3.4.1.1 und 3.4.1.2), dies entspricht der physiologischen Konzentration (AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999).

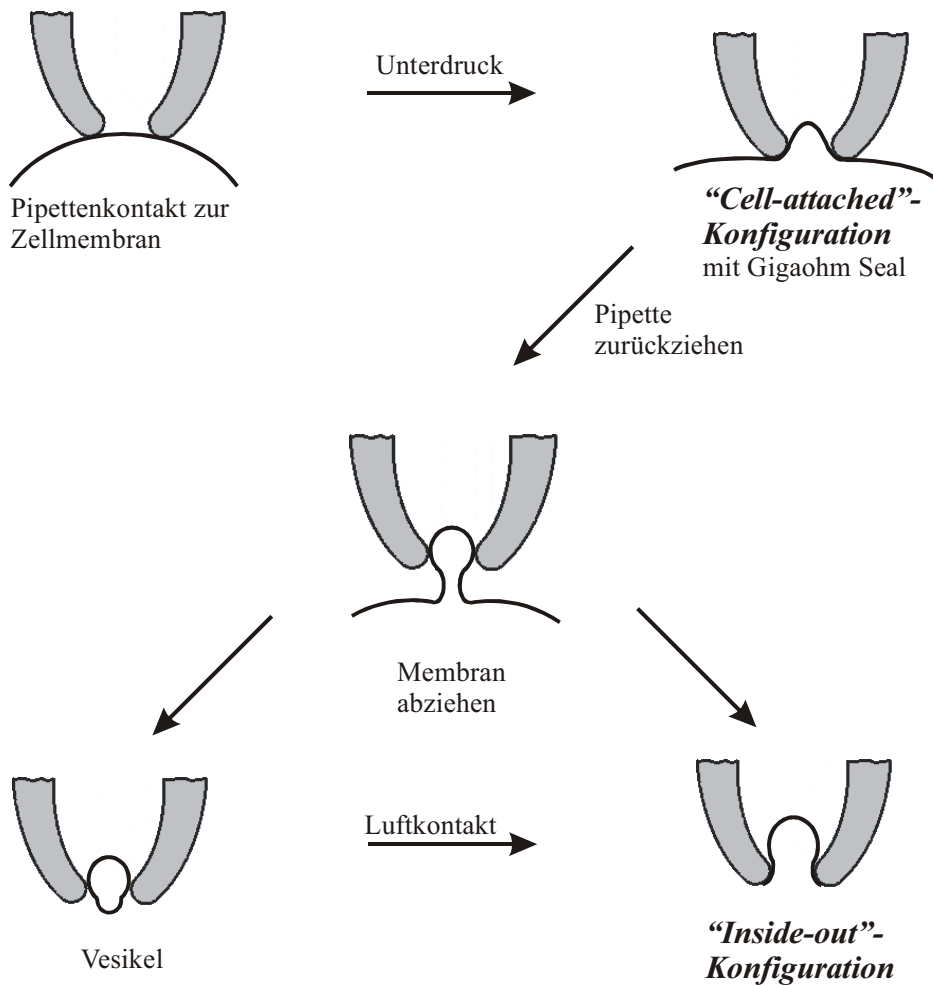


Abb. 10 Patch-Clamp-Konfigurationen (verändert nach HAMILL et al., 1981).

Die „Cell-attached“-Konfiguration wird durch Anlegen eines leichten Unterdrucks und einer negativen Spannung von ca. -20mV erreicht. Durch langsames Abziehen der Pipette von der Zelloberfläche aus der „Cell-attached“-Konfiguration wird ein Membranstück aus der Zelloberfläche abgelöst, und man erhält die „Inside-out“-Konfiguration. Hierbei entstehende Vesikel können durch kurzes Auftauchen der Pipettenspitze aus der Badlösung in die gewünschte „Inside-out“-Konfiguration überführt werden.

3.4.3.4 Applikation der Testlösungen

Alle Testlösungen wurden über das Bad appliziert. Dabei kam das Perfusionssystem PF-8 (E.S.F. electronic, Göttingen) zur Anwendung (für weitere Details s. MARKWORTH, 2001). Hierbei strömt die Testlösung aus einer Perfusionspipette, die in unmittelbare Nähe des „Inside-out“-Patches gebracht wird (Perfusionsgeschwindigkeit etwa 1 ml/min). Die umgebende Badlösung fließt in die gleiche Richtung, so dass aus der Perfusionspipette ein „Flüssigkeitsfilament“ austritt, das innerhalb der laminaren Strömung liegt. Bei dieser Form der schnellen Applikation erfolgt der Lösungswechsel innerhalb von einigen Hundert Millisekunden lokal begrenzt in unmittelbarer Nähe des Patches.

3.5 Datenauswertung

3.5.1 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetische Mittelwerte \pm SEM für N unabhängige Experimente. Signifikanzen wurden unter Verwendung des zweiseitigen U-Tests von Wilcoxon und von Mann und Whitney mit der Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche (WALLENSTEIN et al., 1980) berechnet. $P < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3.5.2 Bindungsexperimente

3.5.2.1 Spezifische Bindung

Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung (s. 3.3.4.2) von der Gesamtbindung bestimmt.

3.5.2.2 Gleichgewichtsbindungen

Folgende Funktion wurde zur Analyse der Beziehung zwischen Substanzkonzentrationen und Bindung verwendet:

$$(1) \quad B = \frac{100 - k}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[A]} \right)^n} + k$$

B ist die spezifische Bindung, [A] die freie Substanzkonzentration, IC_{50} die halbmaximal inhibitorische Konzentration, n der Steigungsparameter (Hill-Koeffizient) und k eine additive Konstante. Die Approximation der Kurven gemäß der beschriebenen Formel erfolgte unter Verwendung des Programms SigmaPlot 2000 für Windows, Version 6.0 (Jandel Scientific).

3.5.2.3 Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten (K_D) für die Bindung an den Sulfonylharnstoffrezeptor wurden unter Verwendung der Beziehung (CHENG und PRUSOFF, 1973) aus den halbmaximal inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) berechnet:

$$(2) \quad K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \left(\frac{[A_R]}{K_{DR}} \right)}$$

K_D ist die Dissoziationskonstante der verdrängenden Substanz, $[A_R]$ die Konzentration und K_{DR} die Dissoziationskonstante des Radioliganden.

3.5.3 Auswertung der Patch-Clamp-Experimente

Die Dichte von K_{ATP} -Kanälen pro Patch bewegte sich zwischen 30 und 800. Diese Schwankungen in der Kanaldichte zeigten keine Effekte auf den Anteil Nateglinid-sensitiver Kanäle (s. 5.4.2, Tab. 1), die IC_{50} -Werte (s. 5.4.2, Tab. 1) oder Hill-Koeffizienten.

Um die Basislinie für die Messung der K^+ -Ströme festzulegen wurde, wenn nicht anders angegeben, in jedem Einzelexperiment der Effekt von 1 mM ATP (alle K_{ATP} -Kanäle geschlossen) registriert.

Während der Applikation von Testlösungen oder Kontrolllösungen, wie z.B. IZ, wurde nach Einstellung des neuen Gleichgewichtes unter Verwendung eines interaktiven Analysenprogramms „pClamp 8.0.1“ (Axon Instruments, USA) der mittlere K_{ATP} -Strom gemessen. Die gemittelten K_{ATP} -Ströme einer vorher ausgewählten Kontrolllösung dienten bei der Auswertung als Bezugsgröße und der in Gegenwart der jeweiligen Testsubstanz bestimmte K_{ATP} -Strom wurde in Prozent dieses festgelegten Wertes angegeben (s. 4.2.1, Abb. 19).

Zur Ermittlung der Konzentrationswirkungskurven (s. 4.2.1, Abb. 20A) wurden Patche ausgewählt, die im Laufe der Messung nur einen geringen „Run-down“ (Verlust an Kanalaktivität < 20%) aufwiesen. Durch lineare Interpolation wurden die Effekte der Testsubstanzen für diesen konstitutiven Verlust der Kanalaktivität korrigiert. Artefakte durch unvollständiges Auswaschen der Testsubstanzen oder langsame Reversibilität der Kanalaktivität wurden ausgeschlossen, indem sichergestellt wurde, dass bei Experimenten mit aufsteigenden Substanzkonzentrationen die gleichen halbmaximal wirksamen Konzentrationen und Steigungsparameter resultierten wie bei Experimenten mit absteigenden Substanzkonzentrationen.

3.5.3.1 Kurvenparameter

Folgende Funktion wurde zur Analyse der Beziehung zwischen Substanzkonzentration und Kanalaktivität verwendet:

$$(3) \quad E = \frac{a - b}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{[A]} \right)^n} + b$$

E ist die Kanalaktivität, EC_{50} die halbmaximal wirksame Substanzkonzentration, $[A]$ die Substanzkonzentration, n der Steigungsparameter (Hill-Koeffizient), a der Maximalwert der Kanalaktivität und b eine additive Konstante.

3.5.4 Berechnung der theoretischen Konzentrationshemmbeziehungen für die Stöchiometrie der Wirkung von Nateglinid

(Beschreibung in Anlehnung an DÖRSCHNER [2000] und MARKWORTH [2001])

Die theoretische Kanalaktivität in Gegenwart einer gegebenen Konzentration von Nateglinid [c] wurde wie folgt berechnet:

$$(4) \quad (1 - b)^4 \quad (\text{Ein-Bindungsstellen-Modell})$$

$$(5) \quad [(1 - b^4 + 4b \cdot (1 - b^3))] \quad (\text{Zwei-Bindungsstellen-Modell})$$

$$(6) \quad 1 - [b^4 + 4b^3 \cdot (1 - b)] \quad (\text{Drei-Bindungsstellen-Modell})$$

$$(7) \quad 1 - b^4 \quad (\text{Vier-Bindungsstellen-Modell})$$

mit b = Wahrscheinlichkeit der Bindung einer Substanz, unter der Annahme K_D und Hill-Koeffizient gleich eins.

Bei vier potenziellen unabhängigen Nateglinid-Bindungsstellen pro tetradimerem Kanalkomplex (entsprechend einer Bindungsstelle pro Sulfonylharnstoffrezeptor), die jeweils die zwei Zustände „besetzt“ und „unbesetzt“ annehmen können, ergeben sich $2^4 = 16$ mögliche Besetzungsvarianten für den Kanalkomplex (s. Abb. 11).

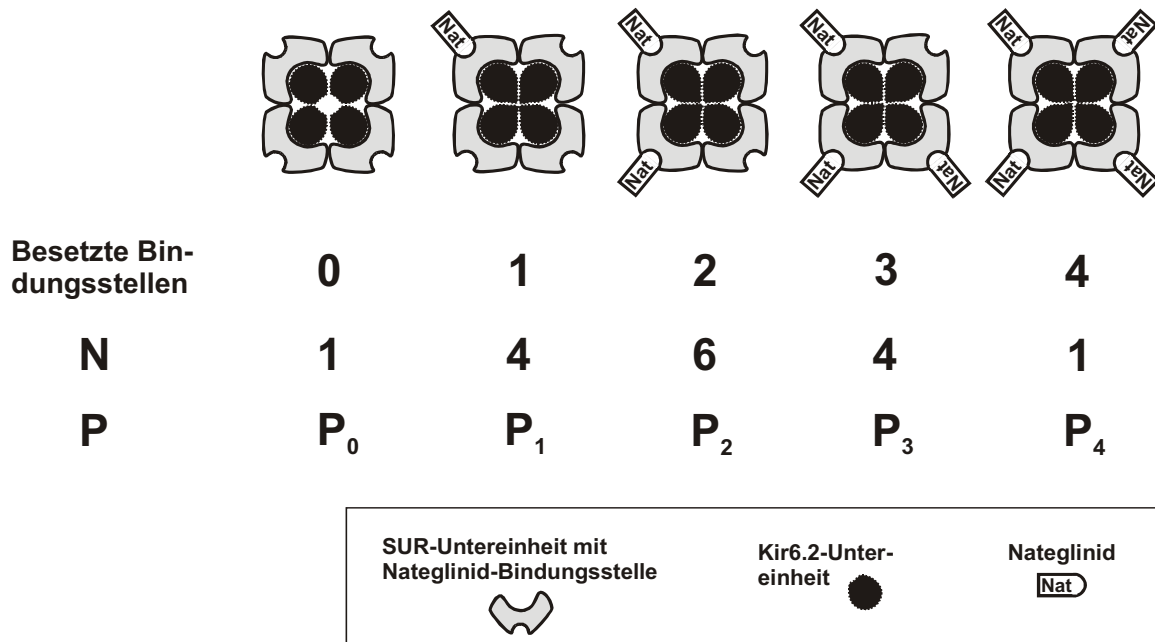


Abb. 11 Beim Ein-Bindungsstellen-Modell bleibt der Kanal nur offen, wenn keine Bindungsstelle durch Nateglinid besetzt ist.

N = Häufigkeit des jeweiligen Zustands (z. B. gibt es von den 16 möglichen Besetzungszuständen vier, bei denen nur eine Bindungsstelle besetzt ist). P_0 bis P_4 stehen für die Wahrscheinlichkeiten des jeweiligen Besetzungsgrades. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der Kanal geschlossen ist, beträgt $(1 - P_0)$.

Unter der Annahme, dass die Besetzung einer einzigen Bindungsstelle genügt, um den Kanal zu schließen (Ein-Bindungsstellen-Modell) sollte nur bei einer dieser sechzehn Möglichkeiten Kanalaktivität registriert werden, und zwar dann, wenn alle vier Bindungsstellen des Komplexes unbesetzt sind. Ist b die Wahrscheinlichkeit für die Besetzung einer Bindungsstelle, ergibt sich die Wahrscheinlichkeit für die Nicht-Besetzung als $(1 - b)$. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Kanalaktivität entspricht dann der Wahrscheinlichkeit für den Zustand, bei dem alle vier Bindungsstellen nicht besetzt sind und ist damit $(1 - b)^4$. Die Ableitung der Wahrscheinlichkeiten für eine Hemmung der Kanalaktivität durch Besetzung von mindestens zwei, drei, oder vier Bindungsstellen (Zwei-, Drei- bzw. Vier-Bindungsstellen-Modell) erfolgt entsprechend.

3.5.5 Theoretische Wahrscheinlichkeiten von Kanalsubtypen

(Beschreibung in Anlehnung an GROSS [2000] und MARKWORTH [2001])

Die theoretischen Wahrscheinlichkeiten (P_k) für die aus der Koexpression hochaffiner (wt) und niederaffiner (mt) SUR- bzw. Kir-Untereinheiten resultierenden Kanalsubtypen wurden unter der Annahme zufälliger Verteilung wie folgt berechnet:

$$(8) \quad P_k = \binom{4}{k} \cdot P^k \cdot (1-P)^{4-k}$$

Vier ist die absolute Anzahl der SUR- bzw. Kir-Untereinheiten pro Kanalkomplex, k ist die Anzahl (0–4) der hochaffinen SUR- bzw. Kir-Untereinheiten (wt) in dem entsprechenden Kanalsubtyp, P oder $(1-P)$ ist die Wahrscheinlichkeit für wt-Untereinheiten bzw. mt-Untereinheiten, an einer der vier Positionen innerhalb des Kanalkomplexes eingebaut zu werden (s. auch 5.1.2, Abb. 36).

3.5.6 Berechnung der theoretischen Aktivität für die ATP-Stöchiometrie in Gegenwart von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten

(Beschreibung in Anlehnung an MARKWORTH [2001])

Die theoretische Aktivität eines der unter 3.5.5 beschriebenen Kanalsubtypen in Anwesenheit einer gegebenen Konzentration der Testsubstanz $[c]$ wurde wie folgt berechnet:

$$(9) \quad \sum_{k=0}^4 P_k \cdot [1 - (1 - b_{wt})^k (1 - b_{mt})^{(4-k)}] \quad (\text{Ein-Bindungsstellen-Modell})$$

$$(10) \quad \sum_{k=0}^4 P_k \cdot [1 - (1 - b_{wt})^k (1 - b_{mt})^{(4-k)} - k \cdot b_{wt} (1 - b_{wt})^{(k-1)} (1 - b_{mt})^{(4-k)} - (4-k) \cdot b_{mt} \cdot (1 - b_{wt})^k (1 - b_{mt})^{(3-k)}] \quad (\text{Zwei-Bindungsstellen-Modell})$$

$$(11) \quad \sum_{k=0}^4 P_k \cdot [b_{wt}^k \cdot b_{mt}^{(4-k)} + k \cdot (1 - b_{wt}) \cdot b_{wt}^{(k-1)} \cdot b_{mt}^{(4-k)} + (4-k) \cdot (1 - b_{mt}) \cdot b_{wt}^k \cdot b_{mt}^{(3-k)}] \quad (\text{Drei-Bindungsstellen-Modell})$$

$$(12) \quad \sum_{k=0}^4 P_k \cdot b_{wt}^k \cdot b_{mt}^{(4-k)} \quad (\text{Vier-Bindungsstellen-Modell})$$

MATERIAL UND METHODEN

Es wurde angenommen, dass die Anordnung der verschiedenen SUR- bzw. Kir-Untereinheiten innerhalb des Kanalkomplexes keinen Einfluss auf die theoretische Aktivität besitzt. P_k und k sind wie unter 3.5.5 beschrieben definiert, b_{wt} bzw. b_{mt} ist die Wahrscheinlichkeit für die Testsubstanz, in einer bestimmten Konzentration c an die hochaffine SUR- bzw. Kir-Isoform (wt) oder die niederaffine SUR- bzw. Kir-Isoform (mt) zu binden. b_{wt} und b_{mt} wurden unter der Annahme nicht-kooperativer Bindung (Hill-Koeffizient = 1) und EC_{50}/K_D -Verhältnissen von 0,17, 0,62, 1,62 bzw. 5,75 für das Ein-, Zwei-, Drei- bzw. Vier-Bindungsstellen-Modell (DÖRSCHNER et al., 1999) aus den Konzentrationswirkungsbeziehungen der Testsubstanz abgeleitet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Interaktion zwischen Nukleosiddi- und -triphosphaten an den K_{ATP} -Kanälen der B-Zelle

In unterschiedlichen Zelltypen, unter anderem auch in den B-Zellen des Pankreas, sind K_{ATP} -Kanäle für die Kopplung des Metabolismus an die elektrische Aktivität von Bedeutung (s. 1.1). Die Regulation der K_{ATP} -Kanalaktivität erfolgt dabei ganz wesentlich durch das zytosolische Verhältnis von ATP zu ADP. Während die Bindungsstelle für das inhibitorische ATP auf Kir6.2 lokalisiert ist, entfalten Nukleosiddiphosphate ihre regulatorische Wirkung über die SUR-Untereinheit des Kanals (s. auch 1.1.2.3 und 1.1.3.2). Ziel dieser Studie war es, die physiologisch bedeutsame Interaktion zwischen Nukleosiddi- und -triphosphaten an den K_{ATP} -Kanälen der B-Zelle genauer zu untersuchen.

4.1.1 Kanalaktivierung durch GDP reduziert die ATP-Empfindlichkeit

Die Nukleosiddiphosphate ADP und GDP stimulieren als Mg^{2+} -Komplex die K_{ATP} -Kanalaktivität in Abwesenheit und auch in Anwesenheit von inhibitorischem ATP (DUNNE und PETERSEN, 1986a und b; FINDLAY, 1987). Um die Wechselwirkung zwischen Nukleosiddi- und -triphosphaten zu analysieren, wurden Hamster-SUR1/Maus-Kir6.2-Kanäle (haSUR1/mKir6.2-Kanäle) in COS1-Zellen transient koexprimiert und die ATP-Empfindlichkeit der rekombinanten Kanäle in der „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik in Versuchsreihen mit variierenden GDP-Konzentrationen bestimmt.

In Abwesenheit weiterer zytosolischer Nukleotide lag die halbmaximal inhibitorische ATP-Konzentration bei $13,6\mu M$ (Abb. 12). Durch Zugabe von millimolarem GDP an der Innenseite der Plasmamembran wurden die K_{ATP} -Kanäle aktiviert und der IC_{50} -Wert für die Hemmung des Kanals durch ATP um den Faktor 30–35 nach rechts auf Werte zwischen $407\mu M$ (1mM GDP) und $476\mu M$ (3mM GDP) verschoben. Die systematische Messung von ATP-Konzentrationshemmkurven in Anwesenheit weiterer GDP-Konzentrationen bestätigte die signifikante Abnahme der inhibitorischen Potenz von ATP in Gegenwart steigender Konzentrationen von GDP, das unter diesen Bedingungen zu etwa 45% als Mg^{2+} -Komplex vorlag. Dabei nahm die halbmaximal inhibitorische Konzentration von ATP mit steigender GDP-Konzentration nicht stetig zu, sondern lief mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H(GDP) = 2,4$ asymptotisch gegen einen Grenzwert von ungefähr $450\mu M$.

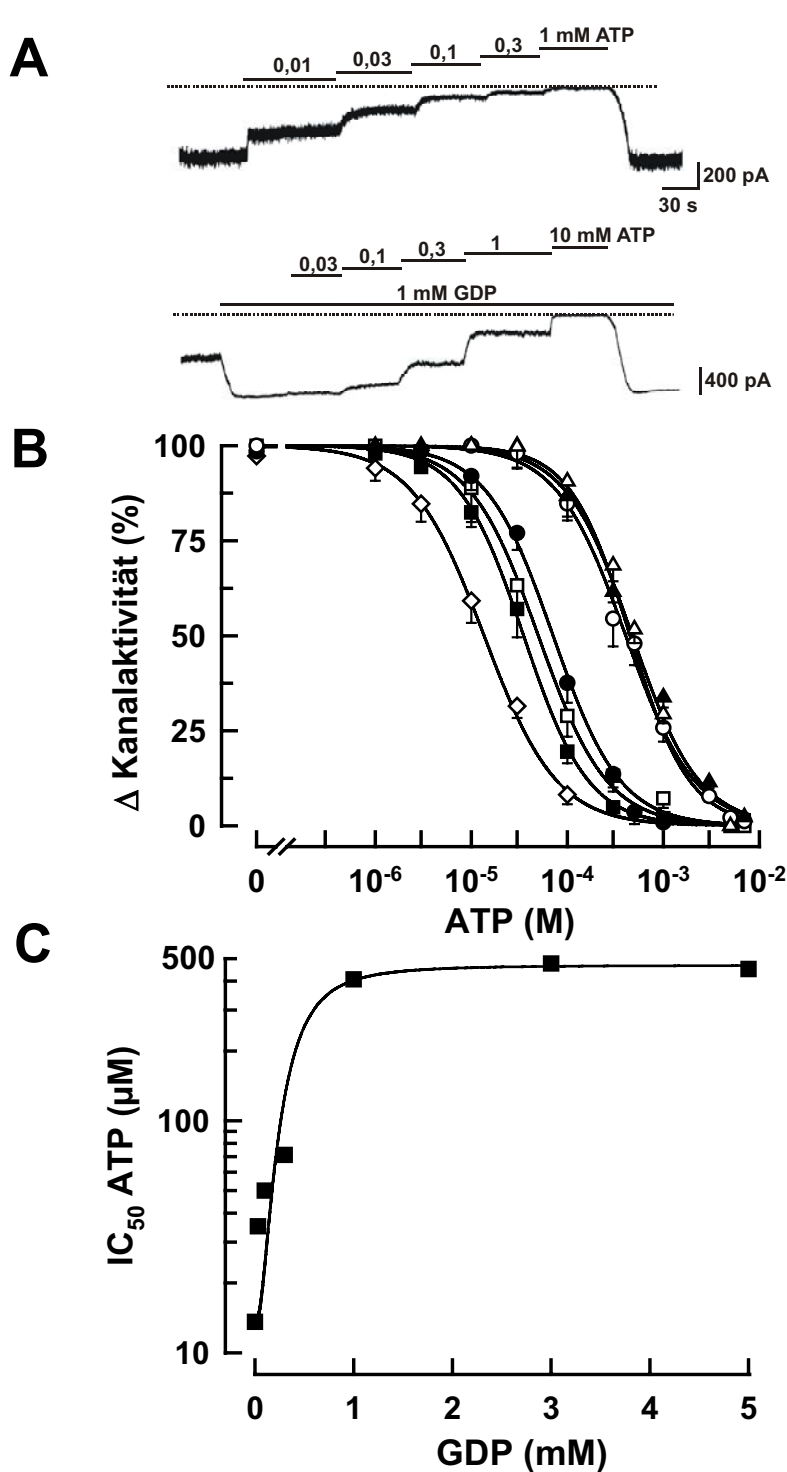


Abb. 12 Einfluss von GDP auf die ATP-Empfindlichkeit von haSUR1/mKir6.2-Kanälen.

(A) Repräsentative Schnell-schreiberregistrierungen von Strömen durch K_{ATP}-Kanäle rekonstituiert aus SUR1-cDNA des Hamsters und Kir6.2-cDNA der Maus in „Inside-out“-Patchen von COS1-Zellen (für weitere Details s. 3.4.3.3). Die horizontalen Linien entsprechen Versuchsphasen, in denen der Patch mit den angegebenen Konzentrationen von ATP bzw. GDP umspült wurde. Die gepunktete Linie symbolisiert einen Zustand, bei dem alle Kanäle geschlossen sind und kein Stromfluss auftritt (0 pA).

(B) ATP-Konzentrations-hemmkurven in An- und Abwesenheit von GDP. Die Messungen zur Ermittlung der Konzentrationswirkungsbeziehungen von ATP in Gegenwart unterschiedlicher GDP-Konzentrationen wurden wie in Teil A dargestellt durchgeführt. Die Auswertung ergab die folgenden IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten für die verschiedenen GDP-Konzentrationen: 13,6 ± 1,0 μM und 1,15 (ohne GDP; ◇); 35,1 ± 2,4 μM und 1,29 (30 μM GDP; ■); 50,0 ±

3,9 μM und 1,22 (100 μM GDP; □); 71,2 ± 6,1 μM und 1,24 (300 μM GDP; ●); 407 ± 47,1 μM und 1,21 (1 mM GDP; ○); 476 ± 57,6 μM und 1,25 (3 mM GDP; ▲); 451 ± 44,2 μM und 1,40 (5 mM GDP; Δ). Aufgeführt sind die Mittelwerte ± SEM aus 5–13 unabhängigen Einzelversuchen.

(C) Der IC₅₀-Wert für ATP läuft in Gegenwart steigender GDP-Konzentrationen auf ein Maximum zu. Die ermittelten IC₅₀-Werte [μM] für ATP sind über der korrelierenden GDP-Konzentration [mM] aufgetragen. Der Hill-Koeffizient der Kurve betrug 2,4 und der halbmaximale IC₅₀-Wert für ATP lag bei einer GDP-Konzentration von 476 μM.

4.1.2 Stöchiometrie der ATP-Wirkung in Gegenwart von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten

In Abwesenheit aktivierender Nukleosiddiphosphate reicht das Besetzen einer einzigen von vier Bindungsstellen durch das inhibitorische ATP pro Kanalkomplex aus, um den Kanal zu schließen (MARKWORTH et al., 2000). Da unter physiologischen Bedingungen in der B-Zelle neben inhibitorischen Nukleosidtriphosphaten auch aktivierende Nukleosiddiphosphate mit dem K_{ATP} -Kanal interagieren und die ATP-Empfindlichkeit herabsetzen, sollte nun der Einfluss von aktivierendem MgGDP auf die Stöchiometrie der ATP-Wirkung untersucht werden.

Analog zur Vorgehensweise bei der Klärung der Stöchiometrie der K_{ATP} -Kanalhemmung über die inhibitorische ATP-Bindungsstelle auf der Kir6.2-Untereinheit in Abwesenheit aktivierender Nukleosiddiphosphate (MARKWORTH et al., 2000) wurden der Wildtyp-Kir6.2 und die ATP-unempfindliche Isoform Kir6.2_{G334D} (DRAIN et al., 1998) in COS1-Zellen transient koexprimiert und die ATP-Sensitivität der mit SUR1 rekonstituierten Kanäle in Gegenwart von 1 mM GDP ermittelt. Die Verteilung der beiden Kir6.2-Isoformen auf die rekombinanten K_{ATP} -Kanäle erfolgte dabei rein zufällig in Abhängigkeit von ihrem Mischungsverhältnis (MARKWORTH et al., 2000). Um eine ausreichende Häufigkeit jedes einzelnen Kanalsubtyps (s. 5.1.2, Abb. 36) zu gewährleisten, wurden für diese Versuche Patche mit mehr als 70 Kanälen ausgewählt (für weitere Details s. 3.5.3).

Die Aktivität der rekombinanten K_{ATP} -Kanäle wurde in der „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik in Lösungen mit 0,7 mM freien Mg^{2+} -Ionen bei einem Membranpotenzial von -50 mV registriert (s. 3.4.3.3). Eine Zugabe von ATP auf der Innenseite der Plasmamembran führte unter diesen Bedingungen bei reinen haSUR1/mKir6.2-Wildtyp-Kanälen zur einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Kanalaktivität, wobei die halbmaximal wirksame ATP-Konzentration wiederum bei etwa 400 μ M lag (Abb. 13; s. auch 4.1.1, Abb. 12). Der Austausch von Glycin in Position 334 des Kir6.2 gegen Aspartat ergibt eine Mutante mit deutlich reduzierter Empfindlichkeit gegenüber ATP (DRAIN et al., 1998). Aus SUR1 und Kir6.2_{G334D} rekonstituierte Kanäle ließen sich zwar durch 1 mM GDP öffnen, waren aber auch durch die höchste eingesetzte ATP-Konzentration (10 mM) nicht hemmbar (Abb. 13).

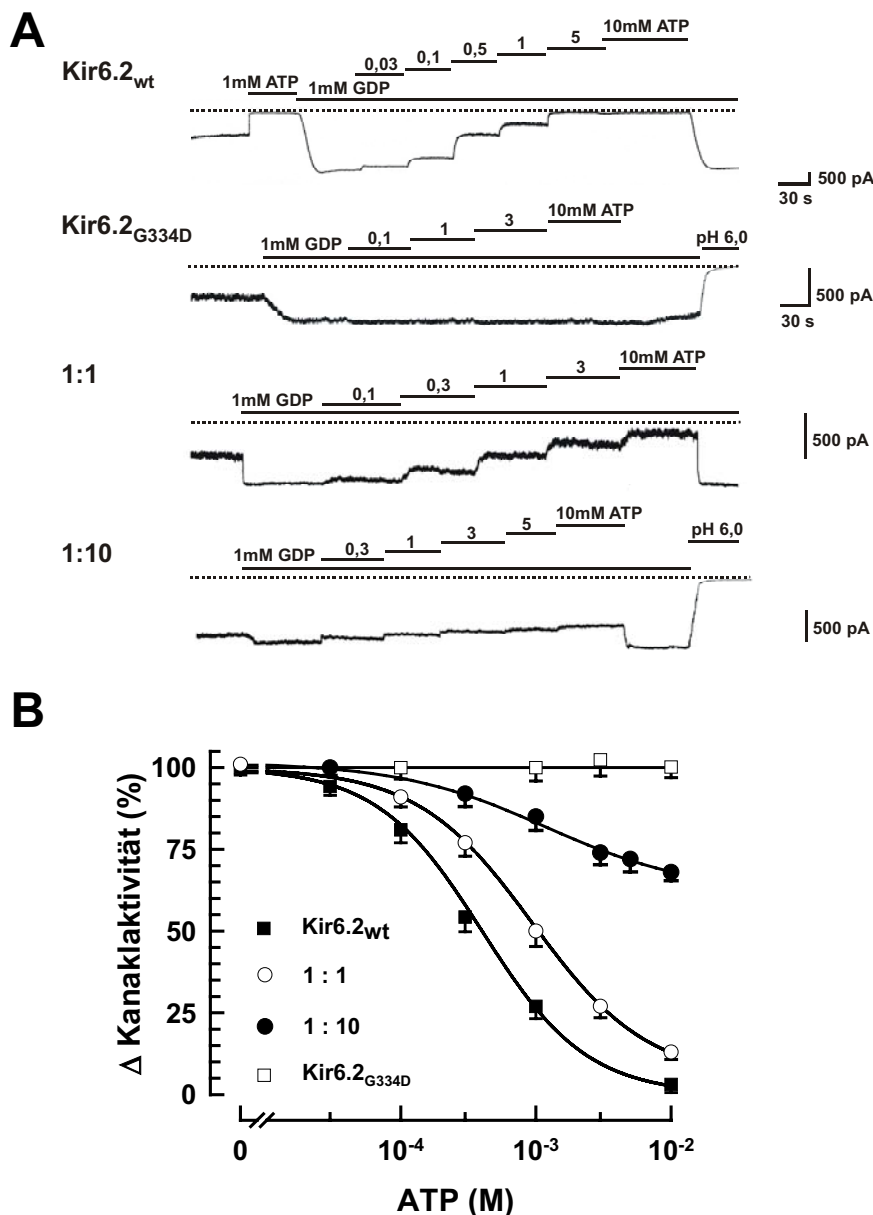


Abb. 13 ATP-Empfindlichkeit von Wildtyp - SUR1/Kir6.2-Kanälen, mutanten SUR1/Kir6.2_{G334D}-Kanälen und Mischkanälen aus SUR1 und den Untereinheiten Kir6.2_{wt} sowie Kir6.2_{G334D} mit einem cDNA-Verhältnis der Kir6.2-Untereinheiten von 1:1 bzw. 1:10 in COS1-Zellen nach Aktivierung durch 1mM GDP.

(A) Schnellschreiberregistrierung von Strömen durch K_{ATP}-Kanäle in „Inside-out“-Patchen (für weitere Details s. 3.4.3.3). Die horizontalen Linien entsprechen Versuchsphasen, in denen der Patch mit den angegebenen Konzentrationen von ATP bzw. GDP umspült wurde. Die gepunktete Linie symbolisiert einen Stromfluss von 0pA (alle Kanäle geschlossen). In den Ver-

suchen mit den ATP-unempfindlichen SUR1/Kir6.2_{G334D}-Kanälen wurde die Basislinie durch den Wechsel auf eine Badlösung mit pH 6,0 ermittelt.

(B) Konzentrationswirkungsbeziehungen für ATP in Gegenwart von 1mM GDP an Kanälen aus SUR1 und Kir6.2_{wt} bzw. mutanten Kir6.2_{G334D}-Untereinheiten. Der Einfluss von ATP auf die Kanalaktivität wurde wie in Teil A dargestellt in der „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik registriert. Die mittlere Kanalaktivität während der Testperiode mit ATP ist in Prozent der mittleren Kanalaktivität in Anwesenheit von 1mM GDP angegeben. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± SEM aus 5–10 voneinander unabhängigen Einzelexperimenten. Die Analyse der Daten erfolgte wie in 3.5.3 beschrieben. Der Anteil sensibler Kanäle, die IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten betrugen: 100%, 392 ± 35,8 μM und 1,21 (Kir6.2_{wt}; ■); 92 ± 1%, 864 ± 93,1 μM und 0,93 (Kir6.2_{wt} und Kir6.2_{G334D} im Verhältnis 1:1; ○); 38 ± 4%, 1,52 ± 0,12 mM und 0,95 (Kir6.2_{wt} und Kir6.2_{G334D} im Verhältnis 1:10; ●).

Wurden die beiden Kir-Isoformen im Verhältnis 1:1 koexprimiert, zeigten die Mischkanäle eine fast ebenso hohe ATP-Empfindlichkeit wie haSUR1/mKir6.2-Wildtyp-Kanäle. Die halbmaximal inhibitorische ATP-Konzentration lag dabei mit einem Wert von 864 μ M etwa um den Faktor 2 höher als bei den reinen Wildtyp-Kanälen. Durch 10mM ATP wurde etwas mehr als 90% der Kanalaktivität unterdrückt (Abb. 13).

Auch bei 10fachem Überschuss der ATP-unempfindlichen Kir6.2_{G334D}-Mutante besaß ATP in Anwesenheit von 1mM GDP noch eine deutliche inhibitorische Wirkung. Maximal wirksame ATP-Konzentrationen reduzierten die Kanalaktivität um etwas mehr als 30% (Abb. 13). Die halbmaximal wirksame ATP-Konzentration betrug 1,5mM und lag damit etwa um den Faktor 4 rechts vom IC₅₀-Wert für reine Wildtyp-Kanäle.

4.1.3 Interaktion von GDP mit der inhibitorischen ATP-Bindungsstelle auf Kir6.2

Unter unseren Versuchsbedingungen (freie Mg²⁺-Konzentration bei 0,7mM, s. 3.4.3.3) bildete GDP ähnlich wie im Zytosol von B-Zellen zu etwa 45% einen Mg²⁺-Komplex aus und lag zu 55% als freie Substanz vor. Um zu klären, ob freies GDP ähnlich wie freies ADP (s. auch 1.2.2) mit ATP um die inhibitorische Bindungsstelle auf Kir6.2 konkurriert, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die inhibitorische Wirkung von GDP ermittelt. Für diese Untersuchung wurden mutante K_{ATP}-Kanäle eingesetzt, bei denen das Lysin in Position 719 im Walker-A-Motiv der NBF1 des Sulfonylharnstoffrezeptors gegen Arginin ausgetauscht worden ist. Aus SUR1_{K719R} und Kir6.2 rekonstituierte Kanäle zeichnen sich durch eine unverminderte Empfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Nukleotiden wie ATP aus, lassen sich aber durch Nukleosiddiphosphate nicht mehr öffnen (GRIBBLE et al., 1997a).

Nach transienter Koexpression von haSUR1_{K719R} und mKir6.2 in COS1-Zellen wurde die Aktivität der rekombinanten Kanäle in der „Inside-out“- Konfiguration der Patch-Clamp-Technik registriert. Steigende GDP-Konzentrationen führten unter diesen Bedingungen zu einer Hemmung der Kanalaktivität (Abb. 14). Allerdings wurden die mutanten K_{ATP}-Kanäle auch durch sehr hohe, millimolare GDP Konzentrationen nur unvollständig geschlossen. 10mM GDP, eine maximal lösliche Konzentration, reduzierte die Kanalaktivität um etwas mehr als 50%, so dass sich ein IC₅₀-Wert von ~7mM ergab.

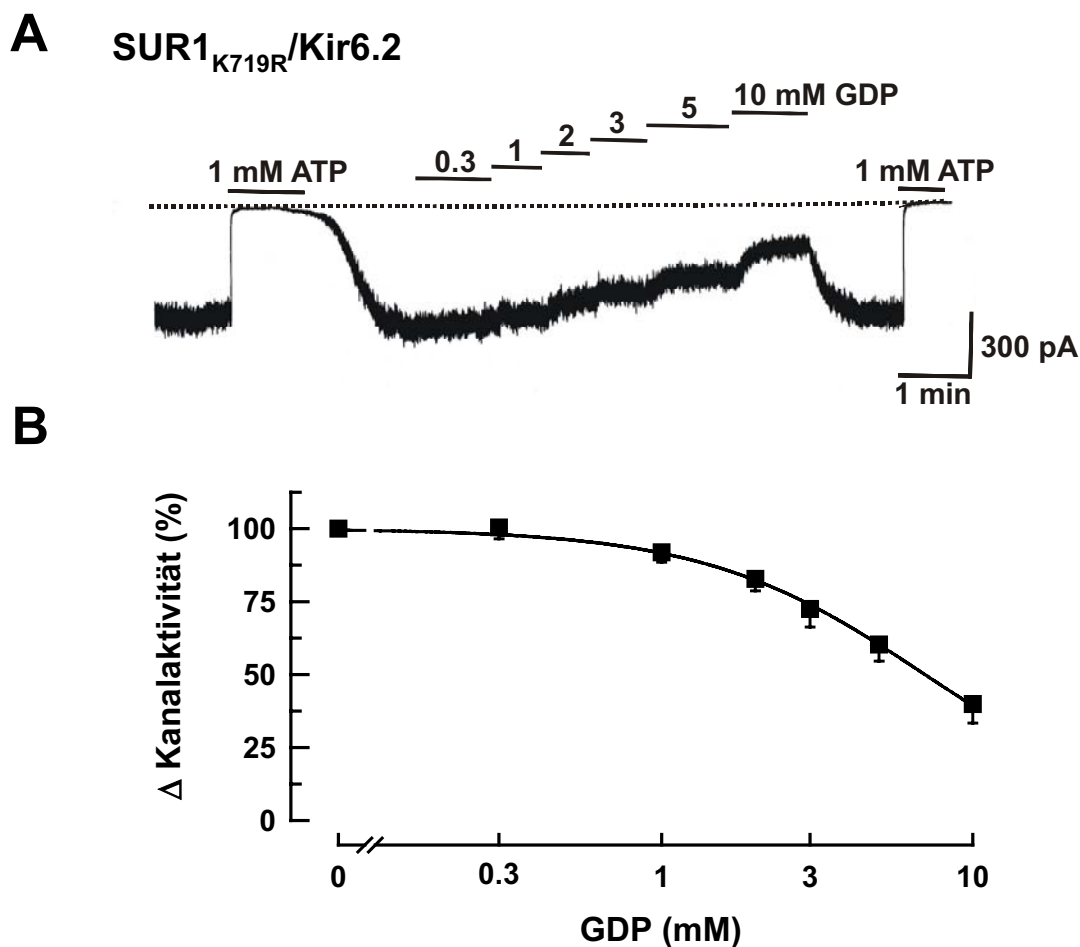


Abb. 14 K_{ATP} -Kanalhemmung durch GDP.

(A) Schnellschreiberregistrierung von Strömen durch haSUR1_{K719R}/mKir6.2-Kanäle in einem „Inside-out“-Patch (für weitere Details s. 3.4.3.3). Die horizontalen Linien bezeichnen Versuchsphasen, in denen der Patch mit den angegebenen Konzentrationen von ATP und GDP umspült wurde. Die gepunktete Linie entspricht einem Stromfluss von 0 pA (alle Kanäle geschlossen).

(B) Konzentrationshemmkurve für GDP an Kanälen rekonstituiert aus haSUR1_{K719R}- und mKir6.2-cDNA. Die mittlere Kanalaktivität während der Testperioden mit GDP ist in Prozent der mittleren Kanalaktivität während der Kontrollperioden (Abwesenheit von Nukleotiden) angegeben. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SEM (falls größer als das Symbol) aus 3 unabhängigen Einzelerperimenten. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.5.3 beschrieben. Der IC_{50} -Wert betrug $7,1 \pm 0,49$ mM und der Hill-Koeffizient lag bei 1,23.

4.1.4 Erhöhte Offenwahrscheinlichkeit induziert einen Zustand mit reduzierter Affinität gegenüber ATP

GDP führt in Mg^{2+} -komplexierter Form über die Interaktion mit einer Bindungsstelle auf SUR1 zur Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle (TRAPP et al., 1997). Um zu klären, ob eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle – unabhängig vom auslösenden Faktor der Aktivierung – mit einer Abnahme der ATP-Empfindlichkeit einhergeht, wurden die mutante mKir6.2_{C166S}-Untereinheit und SUR1 in COS1-Zellen transient koexprimiert. Der Austausch von Cystein in Position 166 im Kir6.2 gegen Serin erzeugt Kanäle, die auch in Abwesenheit von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten nur sehr selten in den langen Geschlossenzustand fallen (s. 5.1.3).

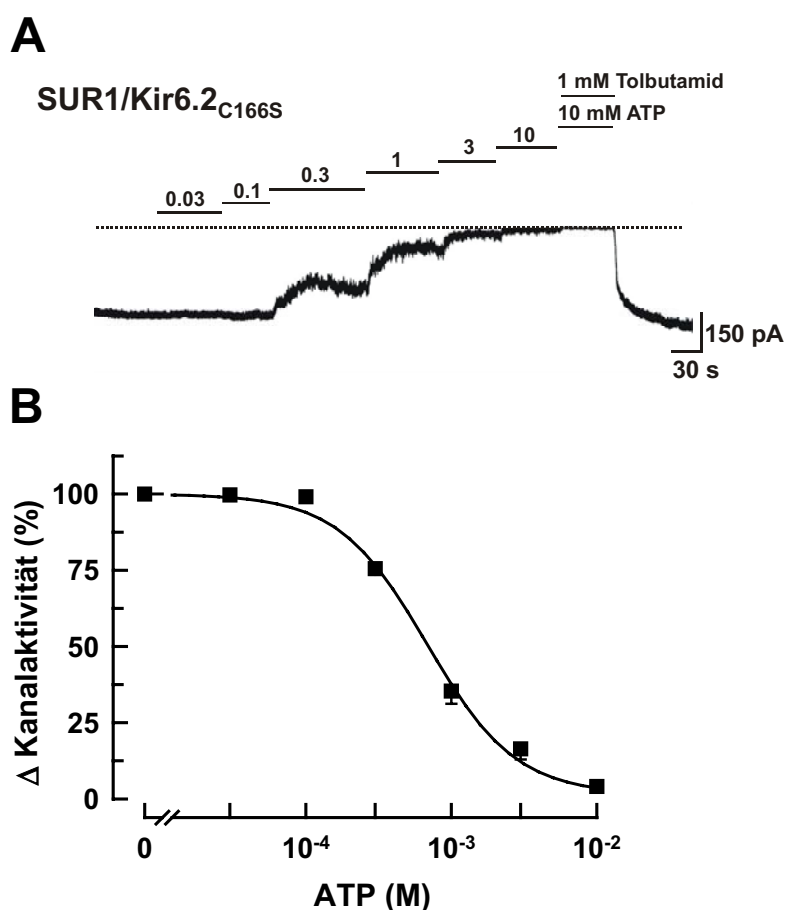


Abb. 15 K_{ATP} -Kanalhemmung durch ATP an Kanälen mit erhöhter Offenwahrscheinlichkeit.

(A) Schnellschreiberregistrierung von Strömen durch SUR1/Kir6.2_{C166S}-Kanäle in einem „Inside-out“-Patch (für weitere Details s. 3.4.3.3). Die horizontalen Linien bezeichnen Versuchsphasen, in denen der Patch mit den angegebenen Konzentrationen von ATP bzw. Tolbutamid umspült wurde. Die gepunktete Linie entspricht einem Stromfluss von 0 pA (alle Kanäle geschlossen).

(B) Konzentrationshemmkurve für ATP an Kanälen rekonstituiert aus haSUR1 und der mutanten Unter-

einheit mKir6.2_{C166S}. Die mittlere Kanalaktivität während der Testperioden mit ATP ist in Prozent der mittleren Kanalaktivität während der Kontrollperioden in Abwesenheit von Nukleotiden und Tolbutamid angegeben. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SEM (falls größer als das Symbol) aus 4 unabhängigen Einzelexperimenten. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.5.3 beschrieben und ergab einen IC_{50} -Wert von $707 \pm 35,9 \mu M$ und einen Hill-Koeffizienten von 1,38.

ERGEBNISSE

SUR1/Kir6.2_{C166S}-mutante Kanäle ließen sich durch ATP schließen, allerdings lag der IC₅₀-Wert für die Hemmung der Kanalaktivität mit ~700 µM – ähnlich wie bei den durch Nukleosiddiphosphate maximal geöffneten Kanälen – deutlich rechts vom IC₅₀-Wert für reine Wildtyp-Kanäle (Abb. 15). Um auszuschließen, dass es sich dabei um einen Effekt handelt, der über eine direkte Beeinflussung der Bindung von inhibitorischem ATP zustande kommt, wurde in der mutanten Kir6.2_{C166S}-Untereinheit zusätzlich die Aminosäure Glycin in Position 334 durch Aspartat ersetzt. Kir6.2_{C166S-G334D} wurde dann einzeln oder im Verhältnis 1:1 mit Wildtyp-Kir6.2 in COS1-Zellen transient koexprimiert und die ATP-Empfindlichkeit der mit SUR1 rekonstituierten Kanäle unter den gleichen Bedingungen wie oben aufgeführt analysiert.

SUR1/Kir6.2_{C166S-G334D}-Kanäle reagierten unempfindlich auf die Zugabe von millimolarem ATP (Abb. 16). Bei den Mischkanälen aus Wildtyp-Kir6.2 und der C166S-G334D-Mutante dagegen wurden durch 10mM ATP mehr als 90% der Kanalaktivität unterdrückt (Abb. 16A, Trace 2). Für die Hemmung der Kanalaktivität der Mischkanäle durch ATP ergab sich ein IC₅₀-Wert von 304 µM (Abb. 16B; □). Dieser lag damit um mehr als den Faktor 10 rechts verglichen mit dem IC₅₀-Wert von 25 µM, der unter diesen Bedingungen an Mischkanälen aus Kir6.2_{wt} und Kir6.2_{G334D} ohne die Mutation C166S ermittelt wurde (MARKWORTH, 2001; s. auch Abb. 16B, gestrichelte Kurve).

ERGEBNISSE

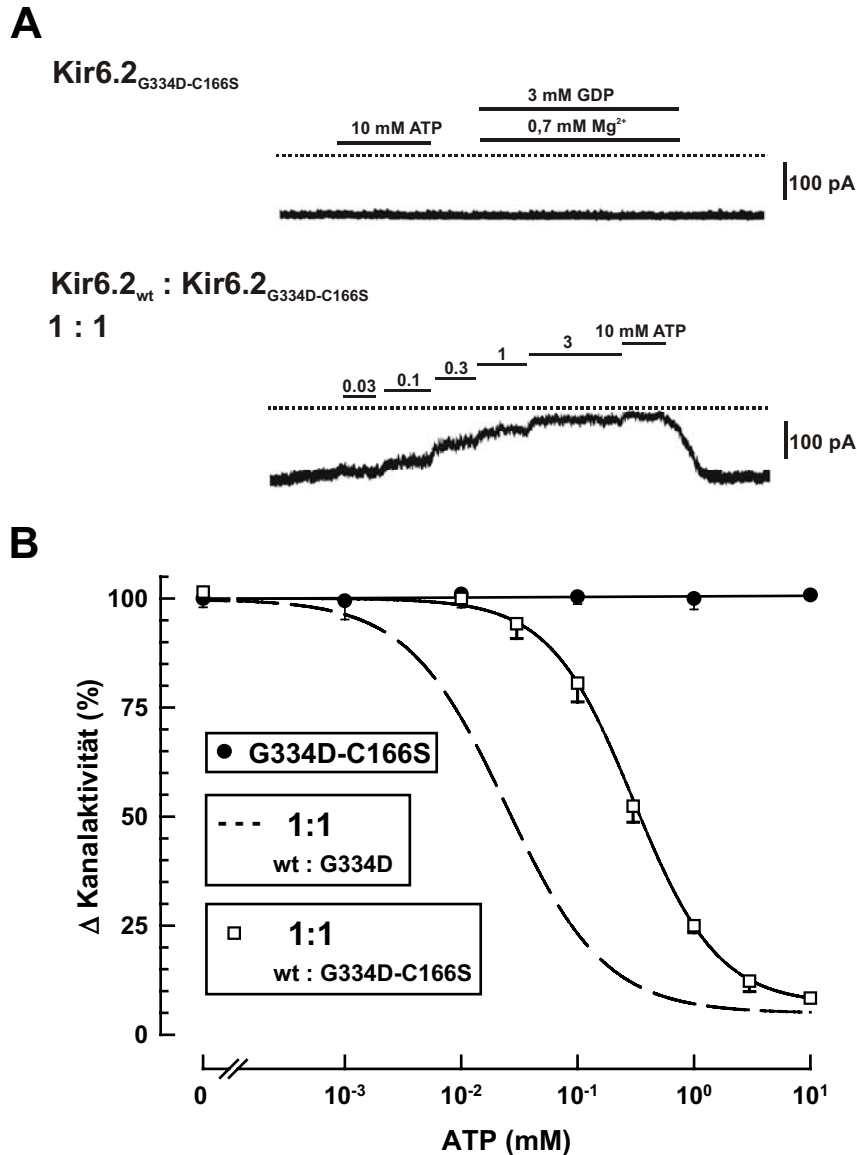


Abb. 16 ATP-Empfindlichkeit von *haSUR1m/Kir6.2_{G334D-C166S}*-Kanälen und Mischkanälen aus *haSUR1* und *mKir6.2_{wt}* sowie *mKir6.2_{G334D-C166S}* (cDNA-Verhältnis der *Kir6.2*-Untereinheiten 1 : 1) in COS1-Zellen.

(A) Schnellschreiberregistrierung von Strömen durch K_{ATP}-Kanäle in „Inside-out“-Patches (für weitere Details s. 3.4.3.3). Die horizontalen Linien entsprechen Versuchsphasen, in denen der Patch mit den angegebenen Konzentrationen von ATP bzw. GDP umspült wurde. Die gepunktete Linie symbolisiert einen Stromfluss von 0 pA (alle Kanäle geschlossen).

(B) Konzentrationswirkungsbeziehungen für ATP an Kanälen rekonstituiert aus SUR1 und Kir6.2_{G334D-C166S} sowie Kir6.2_{wt} mit Kir6.2_{G334D-C166S}. Zum Vergleich ist die entsprechende Kurve für SUR1/Kir6.2_{wt}+Kir6.2_{G334D-C166S}-Mischkanäle (gestrichelte Linie) dargestellt (aus MARKWORTH et al., 2000 und MARKWORTH, 2001). Der Einfluss von ATP auf die Kanalaktivität wurde wie in Teil A dargestellt in der „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik registriert. Die mittlere Kanalaktivität während der Testperioden mit ATP ist in Prozent der mittleren Kanalaktivität während der Kontrollperioden (Abwesenheit von Nukleotiden) angegeben. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± SEM aus 4–13 voneinander unabhängigen Einzelerperimenten. Die Analyse der Daten (s. 3.5.3) ergab folgenden IC₅₀-Wert und Hill-Koeffizienten: 304 ± 21 μM und n = 1,20 (Kir6.2_{wt} und Kir6.2_{G334D-C166S} im Verhältnis 1 : 1; □).

4.1.5 Effekt von aktivierendem GDP auf die Potenz unterschiedlicher inhibitorischer Nukleotide

Neben ATP führen auch andere Nukleotide in Gegenwart einer physiologischen freien Mg^{2+} -Konzentration ($\sim 0,7\text{mM}$) zu einer Hemmung der Aktivität von K_{ATP} -Kanälen in nativen B-Zellen (SCHWANSTECHEER et al., 1992b). Eine Anordnung unter Berücksichtigung ihrer inhibitorischen Potenz ergibt die Rangfolge $ATP_{\gamma}S > ATP > AMP\text{-}PNP > dATP > UTP$, wobei $ATP_{\gamma}S$ offenbar eine höhere, AMP-PNP, dATP und UTP eine geringere Affinität als ATP gegenüber der inhibitorischen Bindungsstelle auf Kir6.2 zeigen (s. Abb. 17). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die gleichzeitige Anwesenheit von aktivierendem GDP (1mM) die Wirksamkeit des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons AMP-PNP reduziert (SCHWANSTECHEER et al., 1992b; SCHWANSTECHEER et al., 1994). Anhand von Patch-Clamp-Studien an rekombinanten haSUR1/mKir6.2-Kanälen in COS1-Zellen sollte daher systematisch das Muster der Empfindlichkeiten gegenüber inhibitorischen Nukleotiden in Gegenwart einer maximal aktivierenden GDP-Konzentration von 3mM untersucht und mit dem in Abwesenheit von GDP verglichen werden (für Details s. 3.4.3.3).

Ähnlich wie bei der ATP-Konzentrationshemmkurve rief die maximale Kanalaktivierung durch 3mM GDP auch eine Rechtsverschiebung der Kurven für $ATP_{\gamma}S$, AMP-PNP sowie UTP um den Faktor 30–35 und für dATP um den Faktor 16 hervor. Die charakteristische Rangfolge der Potenzen blieb dabei unverändert (Abb. 18).

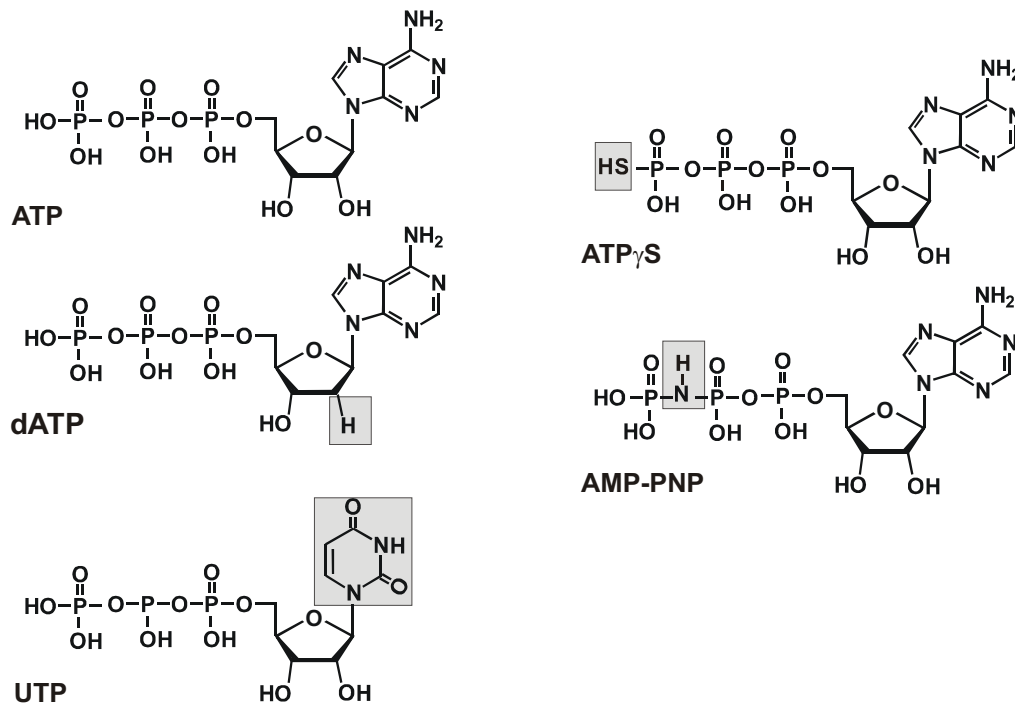


Abb. 17 Strukturformeln von Nukleotiden mit inhibitorischer Wirkung auf den K_{ATP} -Kanal.

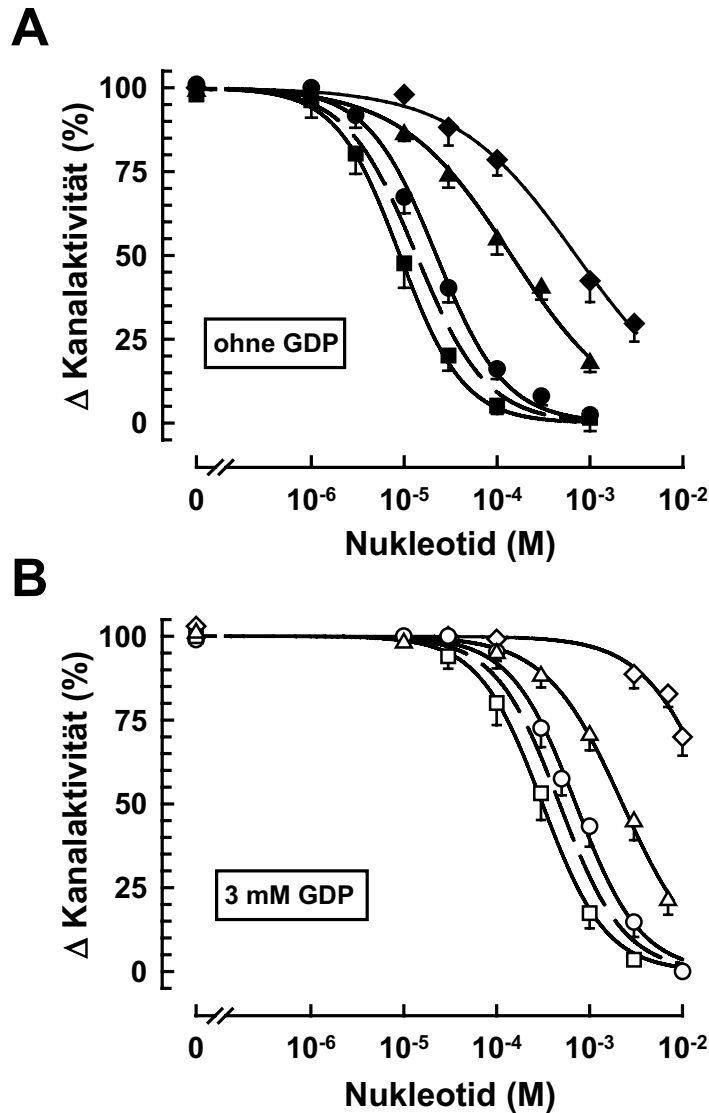


Abb. 18 Konzentrationswirkungsbeziehungen von inhibitorischen Nukleotiden in An- und Abwesenheit von 3mM GDP an haSUR1/mKir6.2-Kanälen.

Die mittlere Kanalaktivität während der Testperioden mit inhibitorischen Nukleotiden ist in Prozent der mittleren Kanalaktivität während der Kontrollperioden mit IZ bzw. 3mM GDP angegeben. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SEM (falls größer als das Symbol) aus 5–11 voneinander unabhängigen Einzelexperimenten. Die Analyse der Daten erfolgte wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben. Die Auswertung ergab folgende IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten in (A) Ab- bzw. (B) Anwesenheit von 3 mM GDP: $9 \pm 0,8 \mu M$ und 1,27 für ATP γ S (■), $22,2 \pm 5,2 \mu M$ und 1,17 für AMP-PNP (●), $142 \pm 18,5 \mu M$ und 0,73 für dATP (▲), $709 \pm 92,4 \mu M$ und 0,67 für UTP (◆) bzw. $311 \pm 34 \mu M$ und 1,26 für ATP γ S (□), $709 \pm 120 \mu M$ und 1,25 für AMP-PNP (○), $2,26 \pm 0,42 mM$ und 1,05 für dATP (Δ), $>23 mM$ für UTP (◇). Eine komplette Kurve zur Bestimmung des genauen IC_{50} -Wertes und Abschätzung des Hill-Koeffizienten für UTP war aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit der Substanz in Konzentrationen über 10mM nicht möglich. Zum Vergleich ist jeweils die entsprechende ATP-Konzentrationshemmkurve in An- und Abwesenheit von 3mM GDP aus Abb. 12B (s. 4.1.1) gestrichelt dargestellt.

4.2 Einfluss des Polymorphismus E23K auf die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen des Pankreas in Gegenwart von Nukleosiddiphosphaten

Der Polymorphismus E23K ist einer von drei [E23K, L270V, I337V] häufig vorkommenden SNPs („single nucleotide polymorphisms“), die in Kir6.2 beobachtet wurden (SAKURA et al., 1996; SCHWANSTECHEER et al., 2002). Seine funktionelle Relevanz basiert auf einer signifikanten Erhöhung der spontanen Offenwahrscheinlichkeit sowie einer Abnahme der ATP-Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle in den B-Zellen des Pankreas. Auf diese Weise prädisponiert E23K durch Induktion einer Überaktivität der entsprechenden K_{ATP} -Kanäle für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes (SCHWANSTECHEER et al., 2002). Da in intakten B-Zellen neben der zytosolischen ATP-Konzentration weitere Faktoren, wie z. B. MgADP und MgGDP, an der komplexen Regulation der Kanalaktivität beteiligt sind, sollte der Einfluss von E23K auf die Kanaleigenschaften in gleichzeitiger Anwesenheit sowohl von aktivierenden als auch von hemmenden Nukleotiden in Patch-Clamp-Studien ermittelt werden. Die beiden Nukleotide ADP und GDP sind in der ruhenden B-Zelle in zytosolischen (freien, d.h. nicht proteingebundenen) Konzentrationen von ungefähr 0,3–1,2 mM bzw. 60 μ M vertreten (MALAISSE und SENNER, 1987; DETIMARY et al., 1996). Jedes Nukleotid für sich ist ein starker Kanalöffner, aber im Gegensatz zu ADP interagiert GDP erst in Konzentrationen über 2 mM mit der inhibitorischen ATP-Bindungsstelle auf Kir6.2 (SCHWANSTECHEER et al., 1994; s. auch 4.1.3). Um eine Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern, wurde in unseren Untersuchungen daher GDP verwendet.

4.2.1 Modulation der ATP-Wirkung in Gegenwart von GDP

Zunächst wurde die Mutation E23K mittels molekularbiologischer Standardverfahren in die humane Kir6.2-cDNA eingebracht und der korrekte Austausch durch eine PCR-Sequenzanalyse bestätigt (s. 3.2.1). Anschließend wurden sowohl reine Wildtyp-Kanäle aus humaner SUR1-cDNA und humaner Kir6.2-cDNA als auch die E23K-Mutante (huSUR1/huKir6.2_{E23K}) in COS1-Zellen transient koexprimiert und in der „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik bei einem Membranpotenzial von -50 mV untersucht (s. 3.4.3.3). Dabei ließen sich reine Wildtyp-Kanäle durch ein Testmedium mit einer GDP-Konzentration von 0,3 mM stark öffnen (Abb. 19). In Gegenwart dieser GDP-haltigen Testlösung führte die gleichzeitige Zugabe von steigenden ATP-Konzentrationen zu einer vollständigen Suppression der Kanalaktivität mit einem IC_{50} -Wert von 71 μ M (Abb. 20). Unter den gleichen experimentellen Bedingungen zeigte die E23K-Mutante einen signifikant schwächeren Effekt.

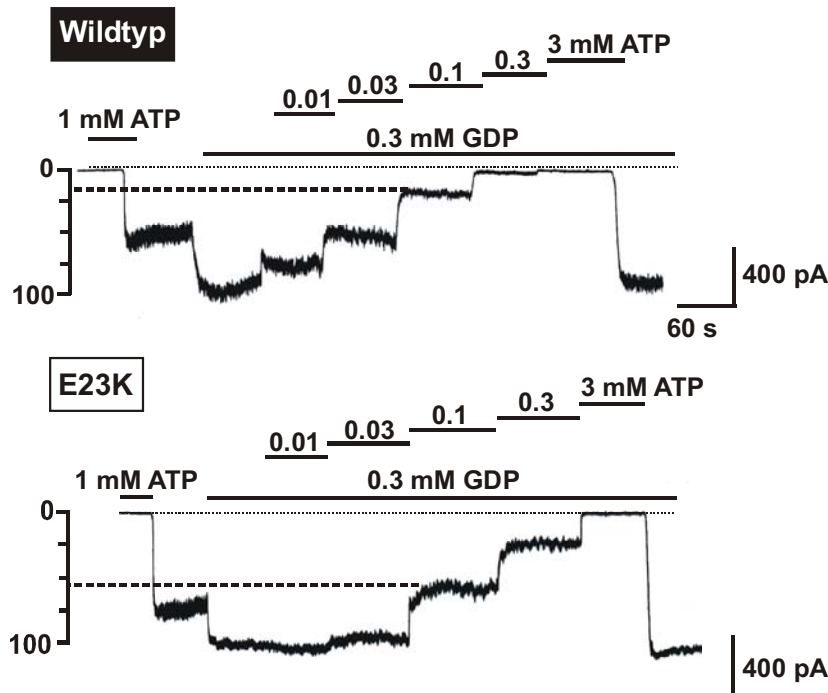


Abb. 19 ATP-Empfindlichkeit von reinen Wildtyp-Kanälen bzw. der Mutante E23K in Gegenwart von GDP.

Die durch Koexpression von humanem SUR1 mit humanem Kir6.2_{wt} oder Kir6.2_{E23K} in COS1-Zellen rekonstituierten Kanäle wurden in der „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik analysiert (für Details s. 3.4.3.3). Dargestellt sind repräsentative Schnellschreiberregistrierungen an beiden Kanaltypen in Gegenwart von unterschiedlichen ATP-

Konzentrationen in aktivierendem GDP (0,3mM), wobei die anwesenden Nukleotidkonzentrationen jeweils durch entsprechende Markierungen über der Registrierung angezeigt werden. Einwärtsströme sind als nach unten gerichteter Ausschlag wiedergegeben. Die gestrichelten Linien kennzeichnen Restkanalaktivität (%) in einer Testlösung mit 0,1mM ATP und 0,3mM GDP. Die gepunkteten Linien entsprechen einem Stromfluss von 0pA (alle Kanäle geschlossen).

Beim Vergleich der beiden Konzentrationshemmkurven (Abb. 20) ergab sich für die aus huSUR1 und huKir6.2_{E23K} rekonstituierten Kanäle eine Rechtsverschiebung der Kurve um den Faktor 1,7 gegenüber reinen Wildtyp-Kanälen. Zusätzlich wurden auch die IC₅₀-Werte für die beiden anderen Polymorphismen L270V und I337V sowie der möglichen Kombinationen der Polymorphismen untereinander ermittelt. Dazu wurden die entsprechenden Mutationen in eine humane Kir6.2-cDNA eingeführt, mit humaner SUR1-cDNA in COS1-Zellen die jeweiligen Kanaltypen mittels transienter Koexpression rekonstituiert und analysiert (s. 3.4.3.3). Eine Rechtsverschiebung der Konzentrationshemmkurve war dabei weder beim L270V- noch beim I337V-Polymorphismus reproduzierbar. Ebenso blieb die Kombination von zwei bzw. drei Polymorphismen in derselben Kir6.2-cDNA ohne Einfluss auf die Wirkung von E23K (Abb. 20B).

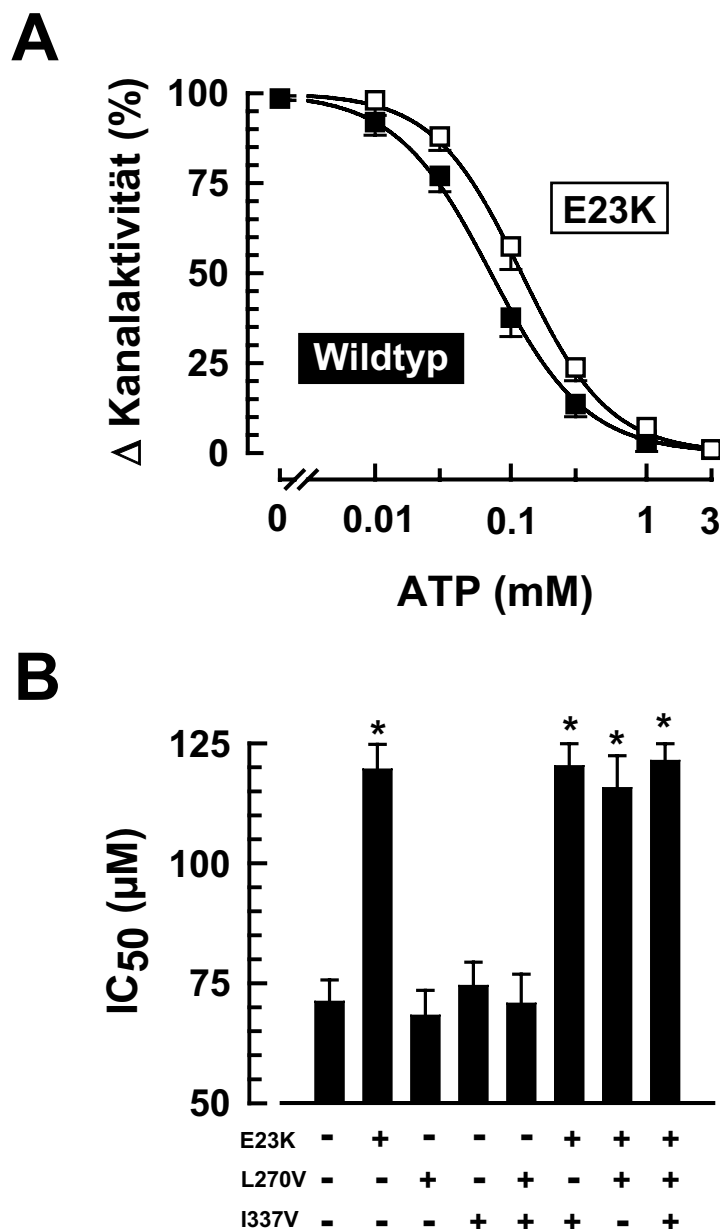


Abb. 20 Wirkung von E23K auf die Potenz von ATP in Gegenwart von GDP.

(A) Potenz von ATP in Gegenwart von 0,3mM GDP. Die Kanalhemmung durch ATP wurde an „Inside-out“-Patchen wie in Abb.19 dargestellt aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwertskurven \pm SEM (falls größer als das Symbol) von 10–15 unabhängigen Einzelversuchen abgebildet. Die IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten betrugen: $71 \pm 4,5 \mu\text{M}$ und 1,22 für den Wildtyp (■) sowie $120 \pm 5,2 \mu\text{M}$ und 1,34 für die E23K-Mutante (□). $P < 0,01$ für die Vergleiche der IC₅₀-Werte.

(B) Der Effekt von E23K auf den IC₅₀-Wert von ATP wurde auch durch das zusätzliche Einfügen von L270V und/oder I337V in den humanen Kir6.2 nicht verändert. * $P < 0,05$ gegenüber dem Wildtyp (Daten aus 8–10 unabhängigen Einzelversuchen).

4.2.2 Modulation der GDP-Wirkung

Die spontane Kanalaktivität von reinen Wildtyp-Kanälen wird durch Zusatz von 10 μ M ATP partiell unterdrückt (Abb. 21). Zugabe steigender GDP-Konzentrationen führt zu einer Reaktivierung der Kanäle mit einem EC_{50} -Wert von 89 μ M (Abb. 22A).

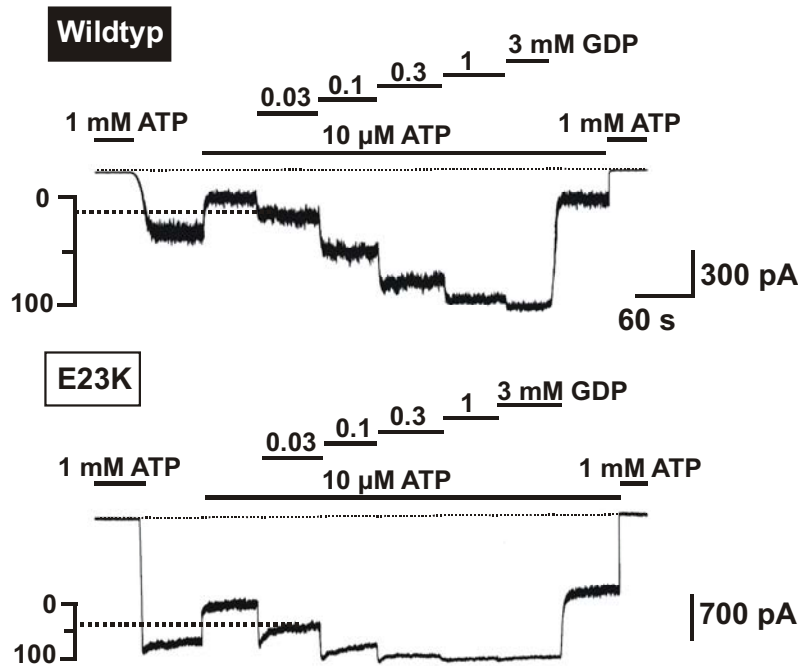


Abb. 21 GDP-Empfindlichkeit von Wildtyp- und E23K-Kanälen.

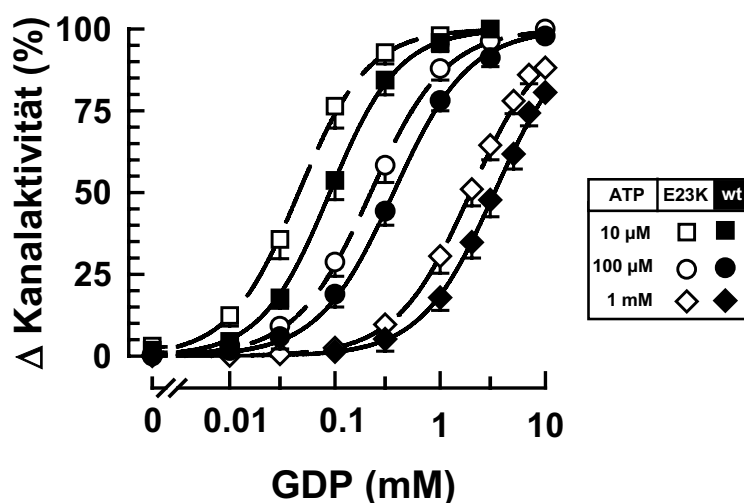
In COS1-Zellen wurden durch Koexpression von humanem SUR1 und Kir6.2_{wt} oder Kir6.2_{E23K} K_{ATP}-Kanäle rekonstituiert und die GDP-Empfindlichkeit in der „Inside-out“-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik analysiert (s. 3.4.3.3). Dargestellt sind repräsentative Schnell-schreiberregistrierungen von Patchen bei Applikation von Testlösungen mit unterschiedlichen GDP-Konzentrationen in 10 μ M ATP, angezeigt durch die Markierungen über den Verläufen. Einwärtsströme sind als nach unten gerichteter Ausschlag dargestellt. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Kanalaktivität (%) in Gegenwart von 30 μ M GDP in Kombination mit 10 μ M ATP. Die gepunkteten Linien entsprechen einem Stromfluss von 0 pA (alle Kanäle geschlossen).

me sind als nach unten gerichteter Ausschlag dargestellt. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Kanalaktivität (%) in Gegenwart von 30 μ M GDP in Kombination mit 10 μ M ATP. Die gepunkteten Linien entsprechen einem Stromfluss von 0 pA (alle Kanäle geschlossen).

E23K verstärkt diesen Effekt signifikant und induziert eine 2fache Linksverschiebung der Konzentrationsaktivierungskurve für GDP (Abb. 21). Vergleichbare Wirkungen wurden bei einer Erhöhung der ATP-Konzentration auf 100 μ M bzw. 1 mM erzielt (jeweils $P < 0,01$; Abb. 22B). Ähnlich wie bei den unter 4.2.1 dargestellten Ergebnissen war der Effekt von E23K auf die Potenz von GDP weder bei L270V oder I337V reproduzierbar, noch wurde er durch das zusätzliche Einbringen von diesen Polymorphismen in die Kir6.2_{E23K}-cDNA verändert (Abb. 22B).

Alle an humanen Isoformen erhaltenen Befunde konnten an Kanälen, rekonstituiert aus dem Kir6.2 der Maus und dem SUR1 des Hamsters, bestätigt werden (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

A



B

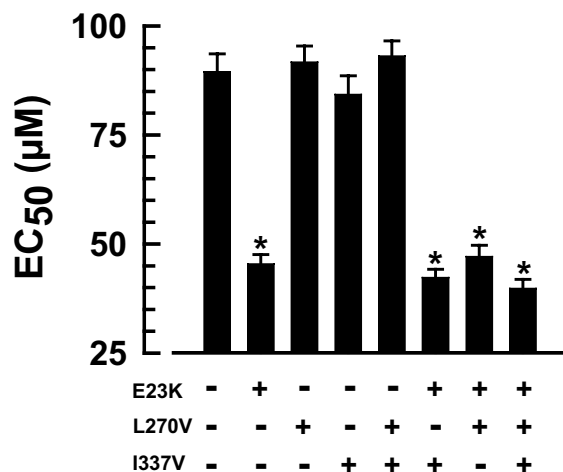


Abb. 22 Effekt von E23K auf die Potenz von GDP in Gegenwart von ATP.

(A) GDP-Empfindlichkeit der Wildtyp- bzw. E23K- K_{ATP} -Kanäle bei gleichzeitiger Anwesenheit von verschiedenen ATP-Konzentrationen (10 μ M, 100 μ M sowie 1 mM). Die Kanalaktivierung an „Inside-out“-Patches wurde wie in Abb. 21 dargestellt aufgenommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwertskurven \pm SEM von 10 unabhängigen Versuchen abgebildet. Die Auswertung ergab folgende EC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten: $89 \pm 4,1 \mu$ M und 1,33 in 10 μ M ATP für den Wildtyp (■) sowie $45 \pm 2,2 \mu$ M und 1,32 in 10 μ M ATP für E23K (□); $362 \pm 18 \mu$ M und 1,21 in 100 μ M ATP für den Wildtyp (●) sowie $219 \pm 7,2 \mu$ M und 1,23 in 100 μ M ATP für E23K (○); $3,29 \pm 0,15$ mM und 1,24 in 1 mM ATP für den Wildtyp (◆) sowie $1,95 \pm 0,08$ mM und 1,23 in 1 mM ATP für E23K (◇). $P < 0,01$ für den jeweiligen Vergleich der EC_{50} -Werte für den Wildtyp und E23K.

(B) Die Wirkung von E23K auf den EC_{50} -Wert von GDP wurde durch zusätzliche Einführung von L270V und/oder I337V in den humanen Kir6.2 nicht verändert. * $P < 0,05$ gegenüber dem Wildtyp (Daten von 8–10 unabhängigen Versuchen).

4.3 Konstruktion eines Targeting-Vektors zur Erzeugung eines Tiermodells mit dem Polymorphismus E23K

4.3.1 Gezielte Genveränderung durch homologe Rekombination

Während früher die Untersuchung der funktionellen Relevanz von SNPs nur an den natürlichen Variationen des Phänotyps möglich war, besteht heute die Möglichkeit, genetisch modifizierte Tiere mit bestimmten Polymorphismen zu erzeugen. Neben zufällig induzierten Mutationen werden inzwischen zunehmend auch zielgerichtete Veränderungen an endogenen Genen mittels homologer Rekombination („gene targeting“) vorgenommen. Zur Überprüfung der physiologischen Effekte von E23K an einem geeigneten Tiermodell mit hetero- bzw. homozygoten Trägern des Polymorphismus, sollte ein „Replacement-Vektor“ („Austausch-Vektor“) konstruiert werden, um mit Hilfe eines „gene targeting“-Verfahrens einen transgenen Mausstamm mit dem entsprechendem Polymorphismus zu etablieren.

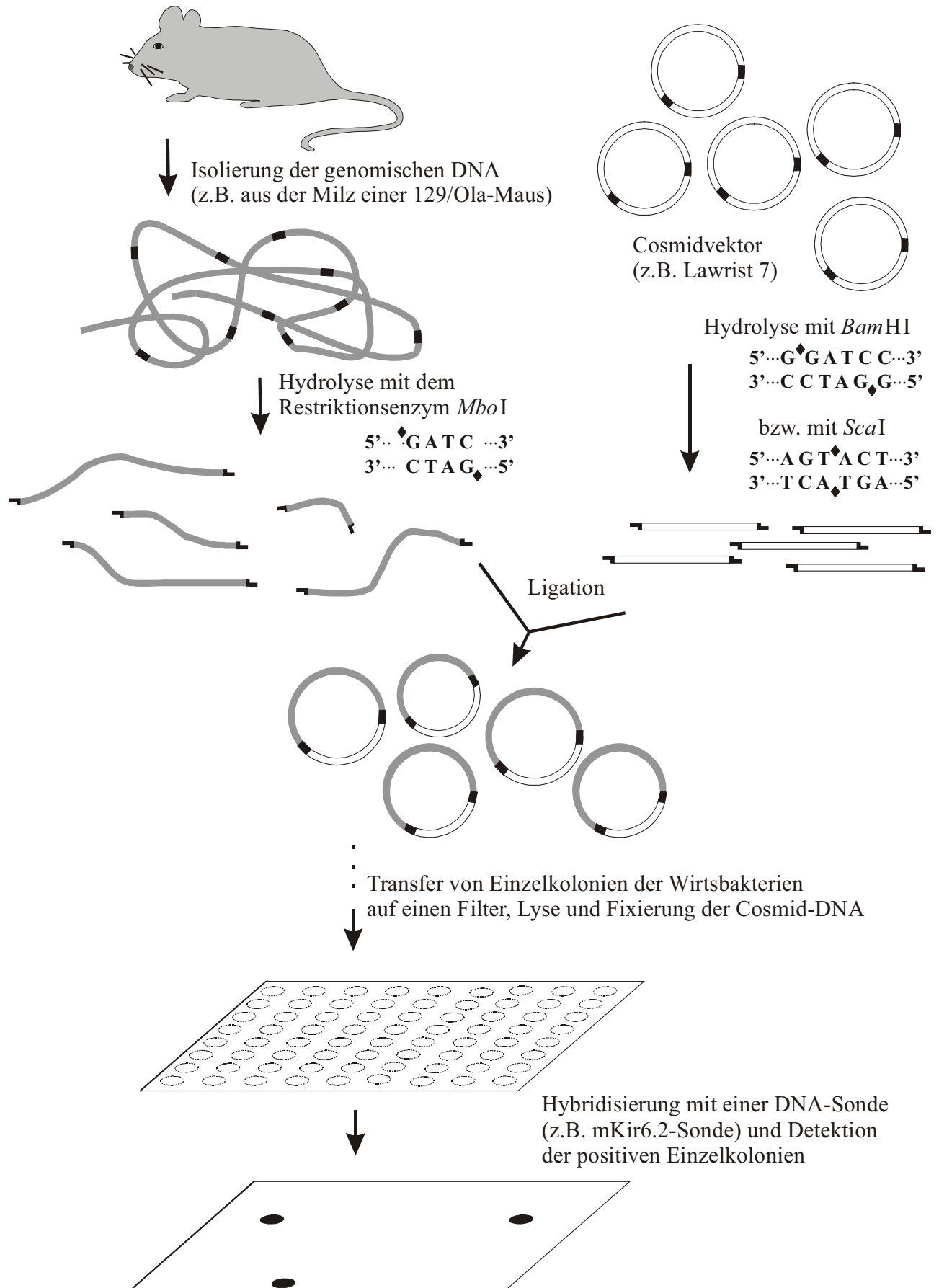
4.3.2 Suche nach muriner genomischer DNA mit dem Gen Kir6.2

Die Frequenz des spezifischen Austausches wird erheblich von der Länge der Homologie zwischen Vektor-DNA und der Zielsequenz im Genom beeinflusst. Je größer die Übereinstimmung ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Targeting-Ereignis auftritt, wobei die Länge unter Berücksichtigung der Voraussetzungen für die molekularbiologischen Arbeitsvorgänge optimalerweise zwischen 5–10kb liegt (SCHENKEL, 1995). Aus diesem Grund wurde als Erstes in einer genomischen DNA-Bibliothek nach einem Klon mit dem murinen Kir6.2-Gen gesucht.

4.3.2.1 Auswahl der geeigneten DNA-Bibliothek

Die ausgewählte genomische DNA-Bibliothek der 129/Ola-Maus (Library #121, RZPD) in *E.-coli*-Wirtsbakterien (DH5 α) bestand aus einer Sammlung von Cosmidvektoren mit nach dem Zufallsprinzip inkorporierten DNA-Fragmenten einer Größe von ungefähr 35–45kb pro Klon, die durch kontrollierte Zerkleinerung der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *Mbo*I gewonnen wurden und zusammen einen großen Teil des Genoms dieser Maus repräsentierten. Sie wurde vom RZPD („Resource Center of the German Human Genome Project“, Berlin) in Form von Filtern, die mit aufbereiteter DNA der einzelnen Cosmid-Klone bestückt waren, direkt für Screening-Untersuchungen mittels Hybridisierungstechnik zur Verfügung gestellt.

ERGEBNISSE



◀ **Abb. 23** (S. 72) *Schematische Darstellung von der Herstellung einer genomischen DNA-Bibliothek im RZPD und vom Screening im DKFZ* (Beschreibung anhand von Informationen zur genomischen Bibliothek #121 vom RZPD).

Zur Produktion der genomischen Bibliothek #121 (RZPD) wurde genomische DNA aus der Milz einer 129/Ola-Maus⁹ gewonnen, mit der häufig schneidenden Restriktionsendonuklease *Mbo*I partiell hydrolysiert und die entstandenen DNA-Fragmente einzeln in vorbehandelte Cosmidvektoren (Lawrist 7) ligiert. Die Cosmide mit der integrierten DNA wurden so in *E.-coli*-Bakterien (DH5 α) transformiert, dass durch die folgende Proliferation jede Vektor-Fragment-Kombination einen eigenen molekularen Klon begründete. Diese vereinzelt Klone wurden auf Filtermembranen transferiert, die Zellen lysiert und die denaturierte zelluläre DNA auf dem Filter fixiert. Mit Hilfe der vorbereiteten und eingeschickten mKir6.2-Sonde wurden vom DKFZ mittels Hybridisierungstechnik Klone mit der gesuchten DNA-Sequenz identifiziert, isoliert und für weitere Untersuchungen getrennt von den übrigen Klonen vermehrt.

Die Hybridisierungsanalyse der Filter wurde beim Screening-Service des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg in Auftrag gegeben.

4.3.2.2 Erstellung der Hybridisierungssonde

Da der murine Kir6.2 keine Introns besitzt, wurde die cDNA des gesuchten Gens selbst als Hybridisierungssonde verwendet. Zu diesem Zweck wurde die cDNA des mKir6.2 über die *Eco*RI- und eine neu generierte *Not*I-Restriktionsschnittstelle aus dem pSV-Vektor isoliert und in den Klonierungsvektor pBluescript[®] II KS bzw. den Expressionsvektor pcDNA3 subkloniert (s. 3.2.2).

Um die Intaktheit des isolierten cDNA-Fragmentes zu überprüfen, wurden der in den pcDNA3-Vektor eingebrachte mKir6.2 mit haSUR1 (im pECE-Vektor) koexprimiert und die rekombinanten K_{ATP}-Kanäle an „Inside-out“-Patchen auf ihre biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften hin untersucht (für weitere Details s. 3.4.3.3). Einzelkanalleitfähigkeit, Expressionsrate, Offenwahrscheinlichkeit und Nukleotid- sowie Arzneistoffempfindlichkeit der rekonstituierten Kanäle waren unverändert.

Das cDNA-Fragment mKir6.2 im pBluescript[®] II KS dagegen wurde zum DKFZ geschickt und diente dort als Vorlage für die Hybridisierungssonde.

4.3.3 Kontrolle der im Screening-Verfahren positiv getesteten Cosmid-Klone

Mit der mKir6.2-Sonde identifizierte das DKFZ in Heidelberg in unserem Auftrag über die Hybridisierung der Filter der ausgewählten genomischen Bibliothek #121 drei unterschiedliche Cosmid-Klone. Eine positive Nachweisreaktion zeigten MPMGc121E02180Q2 (C1),

⁹ Der Mausstamm 129/Ola wird von der „Harlan-Olac-company“ gezüchtet.

ERGEBNISSE

MPMGc121G2171Q2 (C2) sowie MPMGc121B12679Q2 (C3). Diese Cosmid-Klone wurden uns für weitere Untersuchungen vom RZPD zur Verfügung gestellt. Sie wurden entsprechend ihrer Antibiotikaresistenz auf Kanamycin-Agar angezüchtet und als Dauerkulturen in Form von Glycerinstocks (s. 3.2.4.4) für spätere Untersuchungen konserviert. Über PCR-Kontrolle und Southern-Blot-Analyse wurden die Klone auf das Vorhandensein des murinen Kir6.2-Gens überprüft (s. 3.2.7). Dabei zeigten die für mKir6.2 spezifischen Primer A1 und A2 (Abb. 24) im PCR-Screening nur für C1 und C3 positive Banden. Dies deutet darauf hin, dass der mKir6.2 im Klon C2 möglicherweise nur unvollständig enthalten ist.



Abb. 24 Primerauswahl für das PCR-Screening.

Für das PCR-Screening auf den murinen Kir6.2 kamen die Primer A1 und A2 zum Einsatz, die sich jeweils an den äußeren Enden der mKir6.2-cDNA anlagern und somit nahezu das gesamte Gen umfassen. Das positive Screening-Produkt ergab nach der Auftrennung im Agarosegel eine Bande in der Größenordnung von 1148bp.

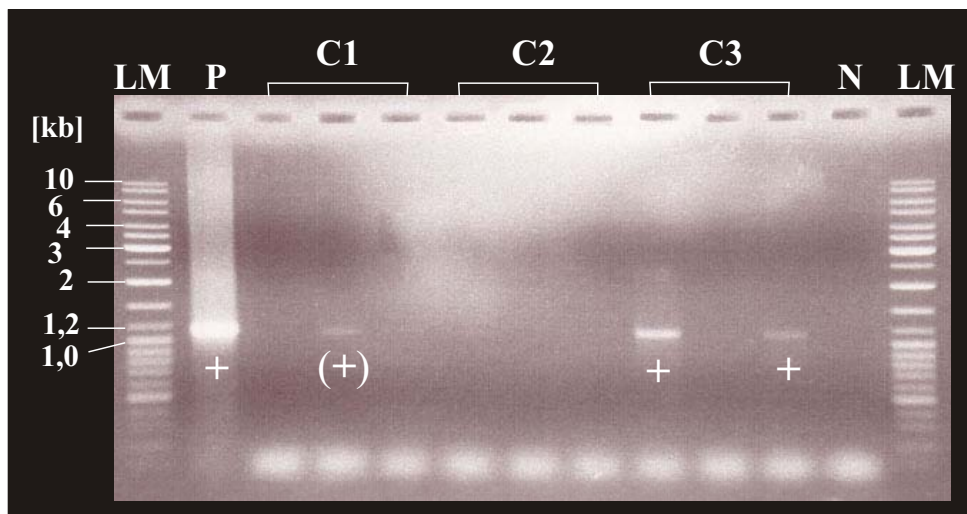


Abb. 25 PCR-Analyse der Cosmid-Klone.

Für die PCR-Analyse (s. 3.2.7.1) wurden pro Cosmid-Klon (C1, C2 und C3) drei Einzelkolonien von der Agarplatte gepickt, geteilt und zur Hälfte in destilliertem Wasser lysiert. Mit den aufgeschlossenen Zellen, einer Positivkontrolle (P) in Form der murinen Kir6.2-cDNA im pBluescript® II KS und einer weiteren Probe ohne DNA-Zusatz als Negativkontrolle (N) wurde die PCR-Reaktion mit den beiden Primern A1 und A2 in 30 Zyklen durchgeführt. Ein Teil der Reaktionsansätze wurde anschließend mit Probenpuffer (s. 3.2.1.4) versetzt und gegen einen Größenmarker (LM) auf einem Agarosegel (1%) in TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 40mV über eine Laufzeit von 2h aufgetrennt (Laufrichtung von oben nach unten). Nach Färbung im Ethidiumbromidbad waren bei 312nm unter dem UV-Transilluminator neben der Positivkontrolle zwei deutliche Banden auf gleicher Höhe bei Klon C3 und eine sehr schwache Bande bei Klon C1 zu erkennen. Dagegen fiel die PCR-Reaktion für sämtliche Einzelkolonien von Klon C2 negativ aus.

4.3.4 Charakterisierung der genomischen DNA in der Umgebung des Gens Kir6.2

Im Rahmen einer Restriktionsanalyse wurde mittels Hybridisierungstechnik bei allen drei Cosmid-Klonen die mKir6.2-Sequenz detektiert. Dazu wurde zunächst die Cosmid-DNA isoliert (s. 3.2.5.2). Die gewonnene DNA wurde daraufhin mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die entweder einzeln oder in variierenden Kombinationen eingesetzt wurden, an spezifischen Nukleotidsequenzen fragmentiert. Hinterher wurden die entstandenen Fragmente anhand ihrer Größe über Gel-Elektrophorese aufgetrennt (Abb. 26). Zur Lokalisation von Fragmenten mit der gesuchten Zielsequenz wurden Southern Blots der Gele (s. 3.2.7.2.3) sowie Hybridisierungen mit der mKir6.2-Sonde (s. 3.2.7.2.6 und 3.2.7.2.7) eingesetzt, wobei in C1 zwei aussichtsreiche Fragmente identifiziert werden konnten. Diese durch *Bam*HI bzw. *Not*I erzeugten Fragmente erfüllten mit einer Größe von ~10kb einerseits die Voraussetzung für eine homologe Rekombination und zeichneten sich andererseits – im Gegensatz zum intakten Cosmid-Insert mit etwa 35kb – aufgrund ihres geringeren Umfangs durch eine leichtere Handhabung bei den folgenden Manipulationen des genetischen Materials aus. Die aufgefundenen Fragmente wurden über die entsprechenden Restriktionsenzyme in den Plasmidvektor pBluescript® II KS subkloniert und abschnittsweise sequenziert (s. 3.2.6). Bei den Sequenzierungen wurde im *Bam*HI-Fragment neben dem Kir6.2-Gen überwiegend DNA des Cosmidvektors entdeckt, womit sich dieses Fragment als ungeeignet für die Vektorkonstruktion erwies.

ERGEBNISSE

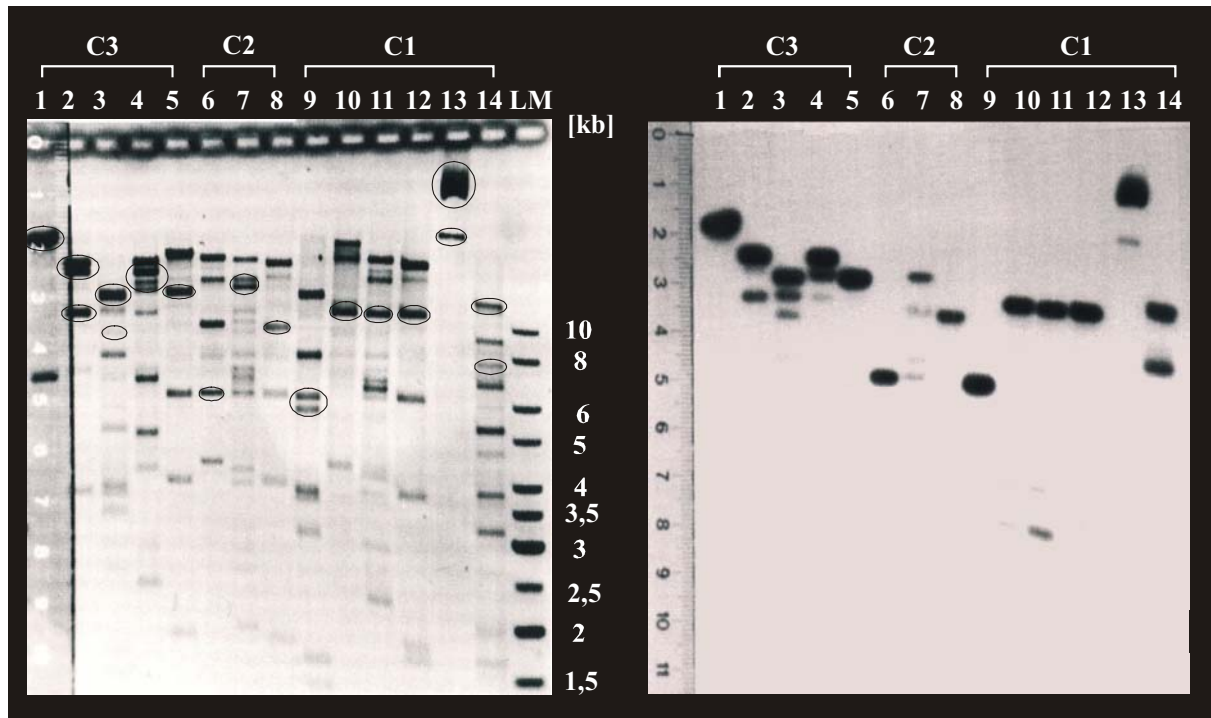


Abb. 26 Beispiel für die Restriktionsanalyse der Cosmid-Klone C1, C2 und C3.

Die Cosmid-Klone wurden mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente über ein 0,8%iges Agarosegel in TAE-Puffer (s. 3.2.7.2.1) elektrophoretisch aufgetrennt. Die linke Seite der Abbildung zeigt das Negativfoto eines Gels bei 312nm unter dem UV-Transilluminator nach Ethidiumbromidfärbung. Die Bahnen sind folgendermaßen belegt: [1] C3 mit *Bam*HI, [2] C3 mit *Sal*I/*Not*I, [3] C3 mit *Sac*I/*Not*I, [4] C3 mit *Spe*I/*Not*I, [5] C3 mit *Sma*I/*Not*I, [6] C2 mit *Xho*I, [7] C2 mit *Spe*I/*Not*I, [8] C2 mit *Sma*I/*Not*I, [9] C1 mit *Sac*I/*Not*I, [10] C1 mit *Cla*I/*Not*I, [11] C1 mit *Spe*I/*Not*I, [12] C1 mit *Sma*I/*Not*I, [13] C1 mit *Mlu*I/*Eco*RI, [14] C1 mit *Stu*I/*Eco*RI. Die Bezeichnung LM steht für den aufgetragenen Größenmarker, wobei die in der Mitte senkrecht angeordneten Zahlen den Gelbanden des Markers die entsprechende Größe in kb zuordnen. Schwarze Kreise (○) heben im linken Teil der Abbildung Banden mit Cosmid-Fragmenten hervor, welche die gesuchten DNA-Sequenzen enthalten. Die rechte Seite der Abbildung stellt das Foto des zugehörigen Röntgenfilms (s. 3.2.7.2.7) dar, auf dem die nach dem Southern Blot (s. 3.2.7.2.3) durch Hybridisierungstechnik (s. 3.2.7.2.6.) mit einer radioaktiv markierten mKir6.2-Sonde (s. 3.2.7.2.5) positiv detektierten Gelbanden als dunkle Flecken zu erkennen sind.

4.3.5 Generierung des Polymorphismus E23K in der genomischen DNA

Für die Konstruktion eines Targeting-Vektors wurde ein etwa 10kb umfassendes *NotI*-Fragment der genomischen murinen DNA aus Cosmid C1 in den pBluescript®II-KS-Vektor (Stratagene) subkloniert und sequenziert. Durch Sequenzanalyse gelang die Identifikation und Lokalisation des gesuchten Kir6.2-Gen in dem Fragment und von Teilen des SUR1 (Exon 34–39) im Abstand von etwa 4,5kb vor dem Kir6.2. Daneben wurde die Abwesenheit von Cosmid-DNA bestätigt.

Um den E23K-Polymorphismus zu generieren und eine zusätzliche Bindungsstelle für ein Restriktionsenzym als stille Mutation für Screening-Untersuchungen einzuführen, wurde das *NotI*-Fragment über das Enzym *NheI* auf ein etwa 4,4kb umfassendes Kernstück mit dem Kir6.2 verkleinert und ebenfalls in den Klonierungsvektor pBluescript®II KS eingebracht. Die zielgerichteten Punktmutationen wurden in zwei Durchgängen – zunächst der E23K-Polymorphismus und anschließend die *SacII*-Schnittstelle – erzeugt (für weitere Details s. 3.2.1.2 und Abb. 27).

Originalsequenz aus dem mKir6.2:

Basensequenz (55–81)	5' –	gag	gac	cct	gca	gag	ccc	agg	tac	cgt	-3'
Aminosäuresequenz (19-27)		E	D	P	A	E	P	R	Y	R	

Mutierte Sequenz des mKir6.2 (E23K und *SacII*):

							<i>SacII</i>				
Basensequenz (55–81)	5' –	gag	gac	cct	gca	aag	ccg	cgg	tac	cgt	-3'
Aminosäuresequenz (19-27)		E	D	P	A	K	P	R	Y	R	

Abb. 27 Erzeugung der Kir6.2-Mutante E23K mit einer zusätzlichen *SacII*-Restriktions-schnittstelle.

Alle Veränderungen wurden durch Punktmutationen eingebracht (s. 3.2.1). Basen: a = Adenin, c = Cytosin, g = Guanin, t = Thymin. Aminosäuren: internationaler 1-Buchstaben-Code. Das codierende Basentriplett für die Aminosäure in Position 23 und der Ort der neu einzuführenden Schnittstelle sind grau unterlegt dargestellt und die veränderten Basen fett hervorgehoben.

4.3.6 Einführung eines positiven Selektionsmarkers

Anschließend wurde im Abstand von 39bp nach dem Stopcodon des Kir6.2 eine von zwei *loxP*-Stellen eingerahmte positive Selektionskassette („*neo*“) mit der bakteriellen Amino-glykosid-Phosphotransferase gekoppelt an einen Thymidinkinase-Promotor angefügt. Das Vorhandensein dieser Kassette kann mit dem Neomycin-Analogon G418 geprüft werden. Die *Neo*-Kassette wurde dem Vektor „neoflox-8“¹⁰ (TORRES und KÜHN, 1997) entnommen. Zur Isolierung wurden die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Not*I eingesetzt. Nach Glätten der Enden mit T4-DNA-Polymerase (s. 3.2.2), wurde die Kassette „blunt end“ über eine *Pml*I-Schnittstelle im Anschluss an das Stopcodon des Kir6.2 in das Fragment ligiert.

4.3.7 Synthese des „Replacement-Vektors“

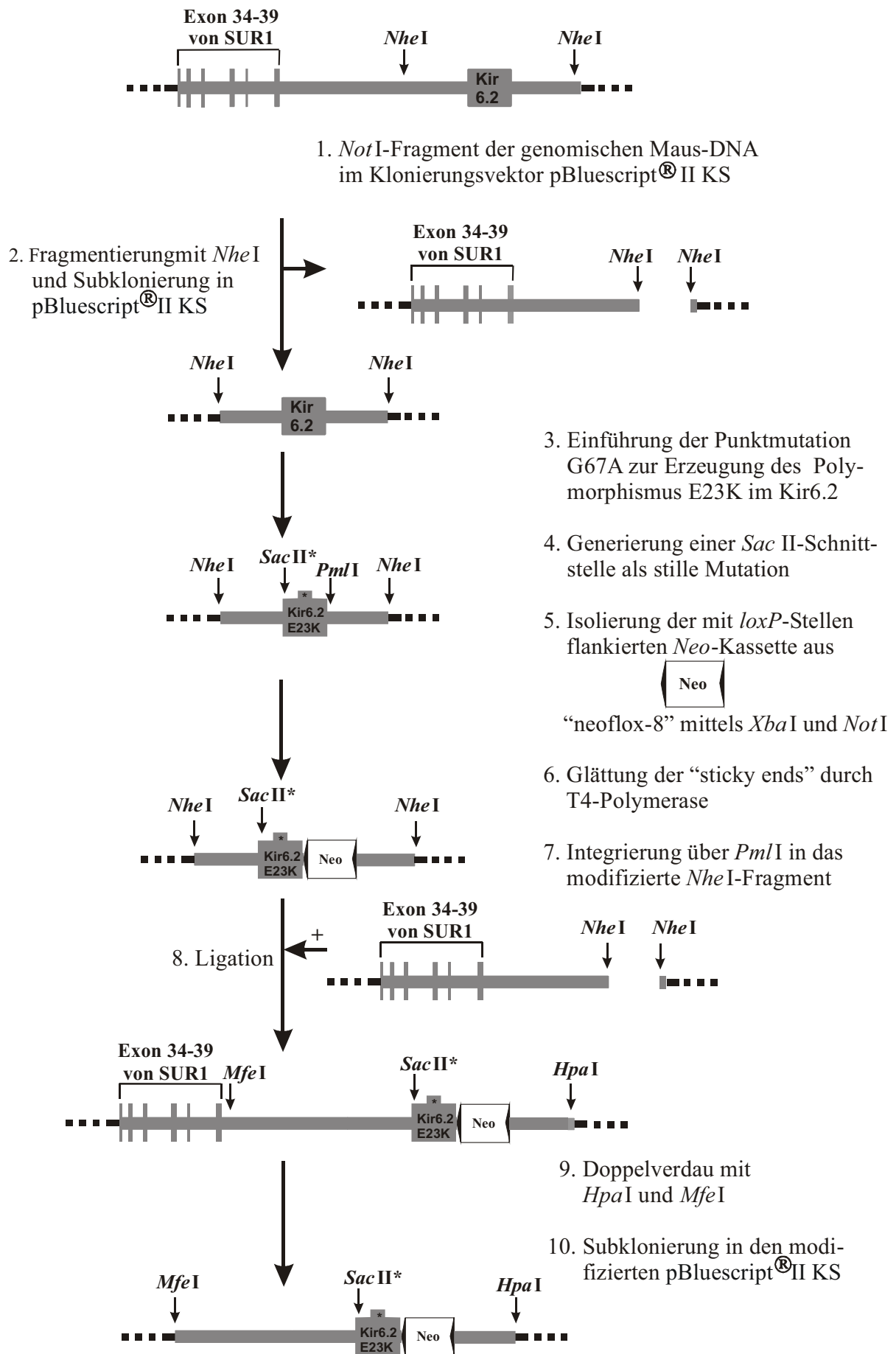
Das veränderte *Nhe*I-Fragment wurde zurück in den geöffneten, über Gel-Elektrophorese aufgereinigten Ausgangsvektor überführt und die richtige Orientierung des ligierten Fragments durch Sequenzierung bestätigt. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurde die Länge des modifizierten *Not*I-Inserts mit den Restriktionsenzymen *Mfe*I und *Hpa*I auf beiden Seiten verringert. Dazu wurde in der „multiple cloning site“ des Vektors pBluescript®II KS durch Punktmutationen die vorhandene *Eco*RI- in eine *Mfe*I-Schnittstelle sowie die *Xba*I- in eine *Hpa*I-Schnittstelle umgewandelt und das entsprechende Fragment genomischer DNA über die neuen Schnittstellen eingefügt (s. 3.2.1 und 3.2.2; Abb. 28).

Abb. 28 (S.79) *Generierung des Polymorphismus E23K in der genomischen Maus-DNA.* ►

Die genomische Maus-DNA ist als grauer Balken dargestellt, wobei bekannte Gensequenzen als grauer Kasten hervorgehoben sind. Der Stern kennzeichnet hierbei das modifizierte murine Kir6.2-Gen mit dem Polymorphismus E23K und einer zusätzlich eingeführten *Sac*II-Schnittstelle. Der Klonierungsvektor pBluescript®II KS ist schwarz gestrichelt. Wichtige Bindungsstellen für Restriktionsenzyme sind mit Pfeilen markiert. Die *Neo*-Kassette als positiver Selektionsmarker wird von zwei gleichgerichteten *loxP*-Stellen flankiert, die als schwarze Dreiecke dargestellt sind.

¹⁰ Der Vektor „neoflox-8“ wurde uns mit Genehmigung der *DuPont Pharmaceuticals Company* freundlicherweise vom Institut für Genetik der Universität Köln zur Verfügung gestellt .

ERGEBNISSE



4.3.8 Überprüfung des Vektors auf die Funktionsfähigkeit der *loxP*-Stellen

Die *Cre*-Rekombinase des Bakteriophagen P1 ermöglicht an einem linearisierten DNA-Molekül eine Exzision der von *loxP*-Stellen eingerahmten DNA-Region in zirkulärer Form unter Zurücklassen einer verbleibenden *loxP*-Stelle, sofern die beiden *loxP*-Stellen in der gleichen Orientierung positioniert wurden (Abb. 29).

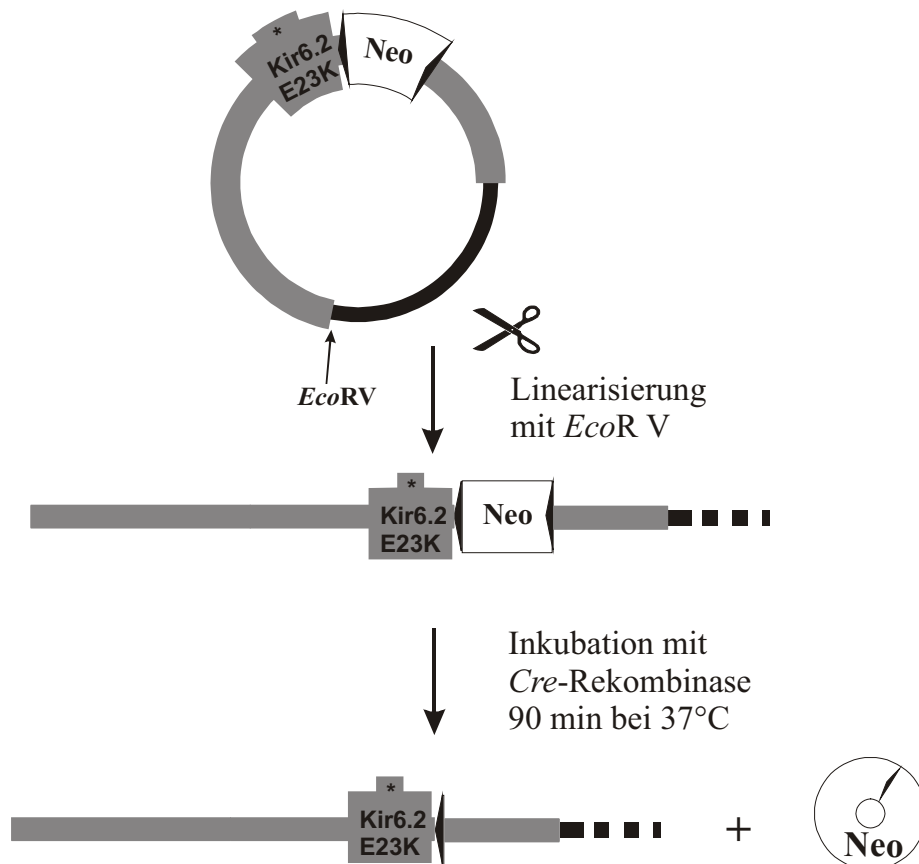


Abb. 29 Schematische Darstellung der Entfernung des positiven Selektionsmarkers aus dem „Replacement-Vektor“.

Die *Cre*-Rekombinase vermittelt ortsspezifische Rekombinationen zwischen *loxP*-Stellen als Erkennungsregionen. Wenn sich zwei *loxP*-Stellen in derselben Orientierung auf einem linearisierten DNA-Molekül befinden, resultiert in Gegenwart von *Cre*-Rekombinase eine Entfernung der *loxP*-eingerahmten Sequenz als ringförmiges Molekül mit einer *loxP*-Stelle, die nach dem intramolekularen Rekombinationsereignis in der DNA verbleibt.

ERGEBNISSE

Die *loxP*-Stellen sind jeweils 34-bp-lange Sequenzen, die aus zwei definierten seitenverkehrten flankierenden Sequenzen (invertierte Wiederholungssequenzen) und einem asymmetrischen Verbindungsstück, welches der *loxP*-Stelle eine Orientierung verleiht, bestehen.

Verbindungsstück

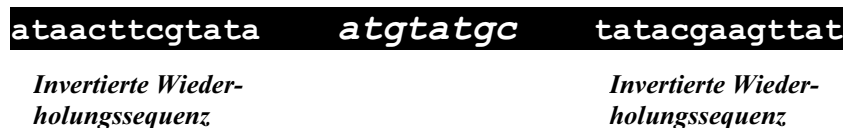


Abb. 30 Aufbau einer *loxP*-Stelle.

Basen: a = Adenin, c = Cytosin, g = Guanin, t = Thymin. Die *Cre*-Rekombinase nutzt die *loxP*-Stelle als Erkennungssequenz.

Um den ordnungsgemäßen Einbau der *loxP*-flankierten *Neo*-Kassette zu überprüfen, wurde das Vektorkonstrukt daher in der „multiple cloning site“ mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* linearisiert und das Enzym anschließend durch Erhitzen (für 10 min auf 80°C) inaktiviert. Dann wurden etwa 270 ng des linearisierten Vektors in *Cre*-Reaktionspuffer gegeben und mit 2 U *Cre*-Rekombinase (New England Biolabs) versetzt. Nach 1,5 h wurde die Reaktionstemperatur von 37°C für 10 min auf 70°C erhöht und das Enzym auf diese Weise ebenfalls hitzeinaktiviert. Mit einem Teil des Ansatzes wurde eine PCR-Reaktion (s. 3.2.1.3) mit den Sequenzierprimern S4 und A7 durchgeführt, um gezielt die veränderte Region unmittelbar im Anschluss an das Stopcodon des Kir6.2 zu amplifizieren.

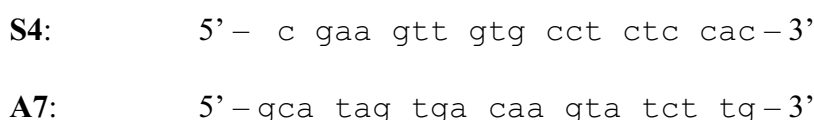


Abb. 31 Sequenzierprimer S4 und A7.

Basen: a = Adenin, c = Cytosin, g = Guanin, t = Thymin.

Die PCR-Produkte wurden über Gel-Elektrophorese aufgereinigt und die gesuchte Bande von etwa 670 kb aus dem Gel extrahiert (s. auch 3.2.2). Die verwendete Taq-Polymerase (SEQLAB) erzeugt trotz eines ausgewogenen dNTP-Gemisches am 3'-Ende der Produkte häufig einen Adenosin-Überhang. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um das isolierte Produkt zur Vorbereitung für eine Sequenzanalyse in den Vektor pGEM[®]-T (Promega) mit Thymin-Überhang zu integrieren. Die Ligation erfolgte unter Berücksichtigung der

ERGEBNISSE

Herstellerangaben bei 4°C über Nacht. Durch Sequenzierung wurde die nahezu vollständige Entfernung der ungefähr 1,2-kb-großen *Neo*-Kassette bestätigt, wobei 50bp Fremd-DNA innerhalb der genomischen Maus-DNA des Vektorkonstruktes zurückblieben.

Ausschnitt aus der Basensequenz des „Replacement-Vektors“:

<i>Stopcodon des mKir6.2</i>	<i>genomische DNA</i>	<i>Neo-Kassette</i>
5' - tga	gttgagttcctcaggccccactcacttgtgtgggcac	ctagactcgaggaatt
	loxP-Stelle	
	cataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat	gcggccctagactcgacggatccgaac
		aaacgacccaacaccggtgcgttttattctgtctttttattgccgatcccctcaga [...]g
		ctcgacattgggtggaaacattccaggcctgggtggagaggctttttgcttcctcttgcaaa
	loxP-Stelle	
	accacactgctcgaggaattc	ataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat gcggccg
		tggaaagtgaagtatggtatgtagagtgggtggggtgcaagcctcttggccagacgagg - 3'

Basensequenz nach Behandlung mit *Cre*-Rekombinase:

<i>Stopcodon des mKir6.2</i>	<i>genomische DNA</i>	<i>verbleibende Fremd-DNA</i>
5' - tga	gttgagttcctcaggccccactcacttgtgtgggcac	ctagactcgaggaatt
	loxP-Stelle	
	cataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat	gcggcc
		gtggaaagtgaagtatggtat
		gtagagtgggtggggtgcaagcctcttggccagacgagg - 3'

Abb. 32 Eliminierung der loxP-flankierten Neo-Kassette.

Die *Neo*-Kassette wurde durch Einwirkung von *Cre*-Rekombinase größtenteils entfernt. Basen: a=Adenin, c=Cytosin, g=Guanin, t=Thymin. In die genomische DNA zusätzlich eingefügte Fremd-DNA ist durch Unterlegung hervorgehoben, wobei die *loxP*-Stellen (s. auch Abb. 30) als Erkennungsregion der *Cre*-Rekombinase invers dargestellt wurden.

4.4 Studie zur Gewebselektivität von Nateglinid an rekombinanten humanen pankreatischen und extrapankreatischen K_{ATP} -Kanälen

Das D-Phenylalanin-Derivat Nateglinid (*N*-[*trans*-4-isopropylcyclohexyl)-carbonyl]-D-phenylalanin) ist ein insulinotropes orales Antidiabetikum, welches seinen therapeutischen Effekt – vergleichbar mit Sulfonylharnstoffen wie z. B. Glibenclamid – über eine Interaktion mit dem K_{ATP} -Kanal (SUR1/Kir6.2) der pankreatischen B-Zelle ausübt. Das ubiquitäre Vorkommen von K_{ATP} -Kanälen im kardiovaskulären System und neuronalen Gewebe bedingt eine hohe Spezifität neuer K_{ATP} -Kanal blockierender insulinotroper Substanzen, um z. B. das Auftreten von potenziellen unerwünschten kardiovaskulären Wirkungen zu vermeiden. Aus diesem Grund sollte die Affinität von Nateglinid für die Bindung an die humanen Isoformen des pankreatischen (SUR1), des kardialen (SUR2A) und des vaskulären (SUR2B) Sulfonylharnstoffrezeptors bestimmt und zusätzlich die Nateglinid-Empfindlichkeit von rekonstituierten humanen pankreatischen (SUR1/Kir6.2), kardialen (SUR2A/Kir6.2) und vaskulären (SUR2B/Kir6.2) K_{ATP} -Kanälen gemessen werden. Das in den Untersuchungen verwendete Nateglinid wurde uns freundlicherweise von der Firma Novartis zur Verfügung gestellt.

4.4.1 K_{ATP} -Kanäle der pankreatischen B-Zelle (SUR1/Kir6.2)

4.4.1.1 Bindung von Nateglinid an den humanen SUR1

Um die Affinität von Nateglinid für die hochaffine Sulfonylharnstoffbindungsstelle auf dem humanen SUR1 zu charakterisieren, wurden Verdrängungsbindungsexperimente mit [3 H]Glibenclamid durchgeführt (für Details s. 3.3). Direkte Bindungsstudien mit [3 H]Nateglinid schienen aufgrund seiner geringen Affinität zur Bindungsstelle wenig erfolgversprechend (HU et al., 2000). Unmarkiertes Nateglinid verdrängte [3 H]Glibenclamid vollständig aus seiner Bindung an den humanen SUR1. Es induzierte dabei eine komplett monophasische Hemmkurve mit einer halbmaximal inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von etwa 690nM und einem Hill-Koeffizienten nahe 1. Aus dem IC_{50} -Wert wurde nach CHENG und PRUSOFF (1973) ein K_D -Wert von 450nM für die Bindung an den SUR1 errechnet (s. 3.5.2.3).

4.4.1.2 Hemmung rekombinanter SUR1/Kir6.2-Kanäle durch Nateglinid

Um die funktionelle Relevanz der Bindung von Nateglinid an den Sulfonylharnstoffrezeptor nachzuweisen, wurde untersucht, mit welcher Potenz Nateglinid rekonstituierte humane SUR1/Kir6.2-Kanäle schließt. Nateglinid konnte die K_{ATP} -Kanalaktivität in „Inside-out“-Patchen mit transient koexprimiertem humanen SUR1 und Kir6.2 konzentrationsabhängig und reversibel hemmen (Abb. 33). Der IC_{50} -Wert von 74nM war um den Faktor 6 ($6,1 \pm 0,6$) niedriger als der K_D -Wert für die Bindung an SUR1. Der Hill-Koeffizient für das durch Nateglinid induzierte Schließen des Kanals war signifikant höher als 1 und lag zwischen 1,11 und 1,25 ($1,15 \pm 0,07$; Abb. 33B). Bei allen getesteten Konzentrationen (10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M und 10 μ M) erfolgte die komplette Hemmung innerhalb von 60s nach Substanzapplikation, mit einer vollständigen Wiederherstellung der Kanalaktivität innerhalb von 90s nach dem Entzug der Substanz (Abb. 33A). Die maximal induzierbare Hemmung der Kanalaktivität durch Nateglinid (3 bzw. 10 μ M der Substanz) betrug $87 \pm 2\%$ in Gegenwart von 0,3mM MgADP (Ergebnisse aus 5 unabhängigen Versuchen; s. auch Abb. 33A) oder $43 \pm 4\%$ in Abwesenheit von MgADP (N=5; Ergebnisse nicht dargestellt).

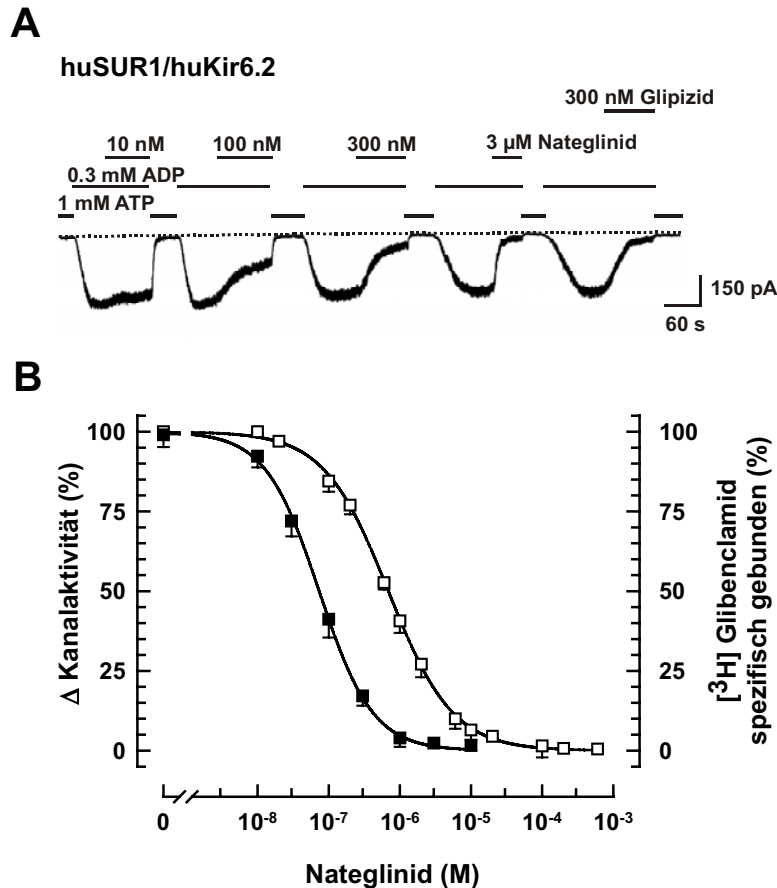


Abb. 33 Bindung von Nateglinid an humanem SUR1 und Hemmung von humanen rekombinanten SUR1/Kir6.2-Kanälen.

(A) Nateglinid-induzierte Hemmung von humanen SUR1/Kir6.2-Kanälen, die transient in COS7-Zellen exprimiert wurden. Die repräsentativen Schnellschreiberregistrierungen der Ströme an „Inside-out“-Patches sind bei einem Membranpotenzial von -50mV in Gegenwart einer physiologischen freien Mg^{2+} -Konzentration ($\sim 0,7$ mM) aufgezeichnet worden (s. 3.4.3.3). Einwärtsströme sind dabei als Auslenkung nach unten dargestellt. Die horizontalen Linien über der Registrierung bezeichnen Versuchsphasen, in denen die Patche von den angegebenen Substanzen (Nukleotiden, Nateglinid oder Glipizid) umspült wurden. Die gepunktete Linie symbolisiert einen Zustand, bei dem alle Kanäle geschlossen sind und kein Stromfluss auftritt (0pA). Die Zugabe von MgADP führte zu einer Verstärkung der maximal induzierbaren Hemmung der Kanalaktivität durch Nateglinid (s. 4.4.1.2). Zum Vergleich definiert Glipizid (300nM) die maximal induzierbare Kanalhemmung durch Sulfonylharnstoffe.

(B) Linke Ordinate: Potenz von Nateglinid (■) bei der Hemmung rekombinanter humaner SUR1/Kir6.2-Kanäle. Die Kanalhemmung wurde wie in Teil A beschrieben gemessen. Die Ergebnisse sind in Prozent der Kanalaktivität in Kontrolllösung vor und nach Zugabe der Testsubstanz dargestellt. Der IC_{50} -Wert und der Hill-Koeffizient lagen bei: 74 ± 11 nM und $1,15 \pm 0,07$. Rechte Ordinate: Affinität von Nateglinid am humanen SUR1 (□). Die Verdrängungsbindungsexperimente mit [³H]Glibenclamid (0,3nM) wurden mit Membranen von COS7-Zellen durchgeführt, die den humanen Wildtyp-SUR1 exprimierten. Alle Inkubationen erfolgten in Tris-Puffer (50mM, pH7,4), der 0,3mM ADP, 0,7mM freie Mg^{2+} -Ionen und die jeweils angegebene Nateglinid-Konzentration enthielt. Die Auswertung ergab folgenden IC_{50} -Wert und Hill-Koeffizienten: 690 ± 48 nM und $0,96 \pm 0,04$. Aufgeführt sind Mittelwerte \pm SEM aus N=5 unabhängigen Einzelerperimenten. Aus dem IC_{50} -Wert wurde wie in 3.5.2.3 beschrieben der entsprechende K_D -Wert von 450 ± 31 nM berechnet.

4.4.2 Rekombinante kardiovaskuläre K_{ATP} -Kanäle

4.4.2.1 Bindung von Nateglinid an die SUR2-Isoformen

Die Affinität von [3H]Glibenclamid für die Bindung an die humanen SUR2-Isoformen ist zu niedrig, um die Sulfonylharnstoffbindungsstelle bei Verwendung von Filtrationsassays direkt nachzuweisen (DÖRSCHNER et al., 1999). Die Charakterisierung der Affinität von Nateglinid an den SUR2-Isoformen (SUR2A und SUR2B) erfolgte deshalb nicht über Verdrängungsbindungsexperimente mit [3H]Glibenclamid, sondern indirekt durch allosterische Hemmung der hochaffinen [3H]P1075 Bindung (DÖRSCHNER et al., 1999).¹¹ Um [3H]P1075-Bindung zu ermöglichen, wurden die Untersuchungen in Gegenwart von 0,1mM ATP durchgeführt (DÖRSCHNER et al., 1999).

Nateglinid induzierte hierbei ähnlich wie am SUR1 eine komplette monophasische Verdrängung mit Hill-Koeffizienten nahe eins ($1,00 \pm 0,03$ für SUR2A und $0,99 \pm 0,04$ für SUR2B; Abb. 34). Die ermittelten Dissoziationskonstanten ($45 \pm 2 \mu M$ für SUR2A und $51 \pm 5 \mu M$ für SUR2B; s. 4.4.2.2, Abb. 34) lagen etwa um den Faktor 100 höher als der vergleichbare K_D für die Bindung am humanen SUR1.

4.4.2.2 Hemmung rekombinanter SUR2/Kir6.2-Kanäle durch Nateglinid

Nateglinid hemmt schnell und reversibel die Aktivität von transient exprimierten humanen SUR2A/Kir6.2- und SUR2B/Kir6.2-Kanälen (Abb. 34B). Die IC_{50} -Werte betrugen $8,4 \pm 1,7 \mu M$ (SUR2A/Kir6.2) bzw. $11 \pm 0,5 \mu M$ (SUR2B/Kir6.2) und waren damit um mehr als den Faktor 100 höher als der IC_{50} -Wert an den SUR1/Kir6.2-Kanälen (Abb. 34C). Vergleichbar mit der Situation für SUR1/Kir6.2 lagen die Werte 5,4fach ($5,4 \pm 0,7$ für SUR2A) bzw. 4,5fach ($4,5 \pm 0,8$ für SUR2B) niedriger als die K_D -Werte für die Bindung an die entsprechenden SUR2-Isoformen. Für die Konzentrationshemmkurven ergaben sich Hill-Koeffizienten von $1,22 \pm 0,05$ (SUR2A/Kir6.2) und $1,37 \pm 0,07$ (SUR2B/Kir6.2). Die durch Interaktion mit der SUR2-Untereinheit maximal induzierbare Hemmung der Kanäle durch Nateglinid belief sich auf $52 \pm 5\%$ (SUR2A/Kir6.2) bzw. $48 \pm 5\%$ (SUR2B/Kir6.2).

¹¹ P1075 gehört als Pinacidil-Analogen zur Gruppe der Kaliumkanalöffner. In Untersuchungen an einer SUR-Chimäre mit den charakteristischen pharmakologischen Eigenschaften von SUR2 (hohe Empfindlichkeit gegenüber P1075) und SUR1 (hohe Empfindlichkeit gegenüber Glibenclamid) konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass die Verdrängung von P1075 aus der Bindung an SUR2-Isoformen geeignet ist, um die Affinität für die Bindung von Sulfonylharnstoffen und deren Analoga korrekt zu erfassen (TOMAN, 2001).

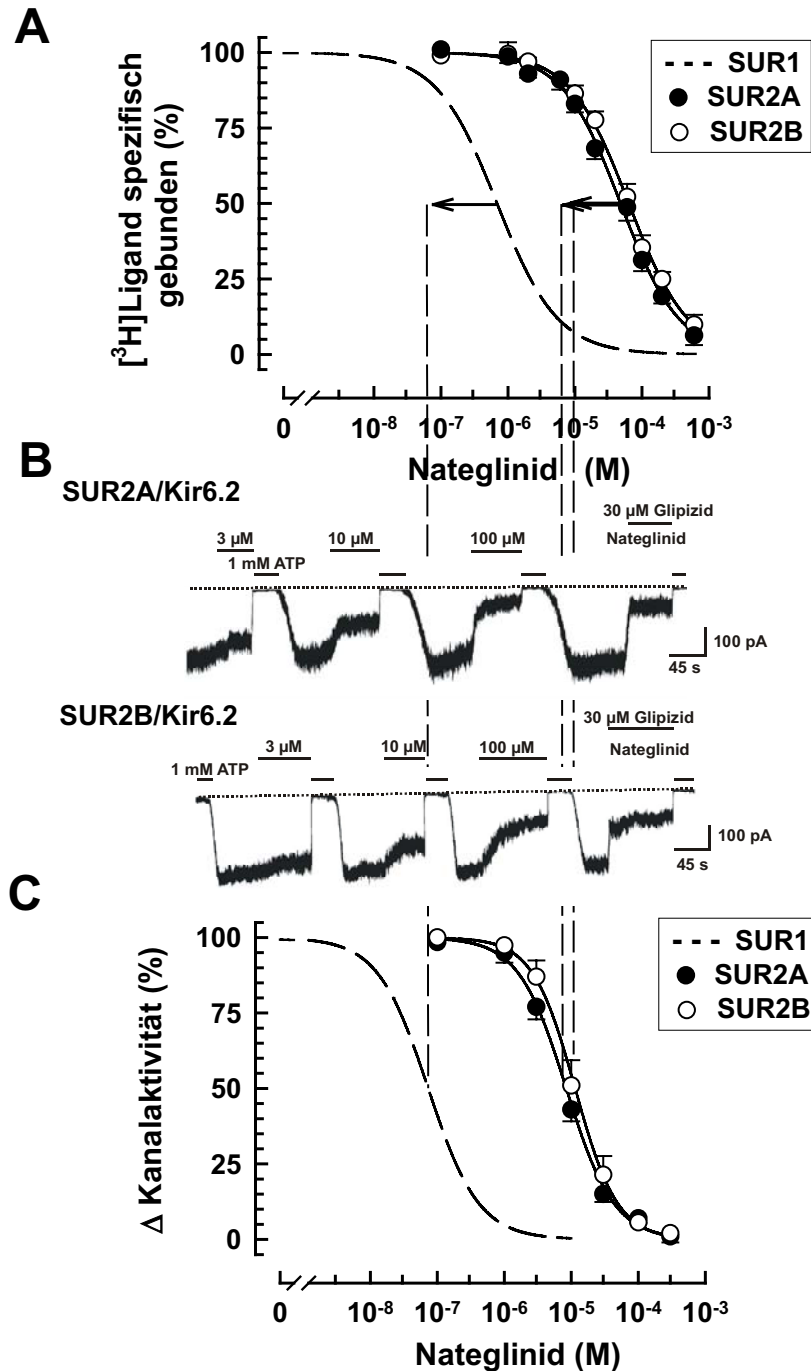


Abb. 34 Wirkung von Nateglinid an humanen kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen.

(A) Bindung von Nateglinid an humane SUR2-Isoformen. Die Verdrängungsbindungs-experimente mit [³H]-P1075 wurden an Membranen von COS7-Zellen durchgeführt, die den jeweiligen Wildtyp-Rezeptor exprimierten (für Details s. 3.3.4.2B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (N=5). Die Auswertung ergab K_D -Werte von $45 \pm 2 \mu\text{M}$ für SUR2A (●) sowie $51 \pm 5 \mu\text{M}$ für SUR2B (○). Zum Vergleich wurde die entsprechende Kurve für SUR1 aus Abb. 33B (s. 4.4.1.2) als gestrichelte Linie übernommen.

(B) Einfluss von Nateglinid auf die Aktivität kardiovaskulärer K_{ATP} -Kanäle in „Inside-out“-Patches. Dargestellt sind repräsentative Schnell-schreiberregistrierungen von Strömen durch rekombinante humane SUR2A/Kir6.2- bzw. SUR2B/Kir6.2-Kanäle

(für weitere Details s. 4.4.1.2, Abb. 33A).

(C) Hemmung rekombinanter humaner SUR2/Kir6.2-Kanäle durch Nateglinid. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (N=5). Zum Vergleich wurde die Konzentrationshemmkurve für Nateglinid an humanen SUR1/Kir6.2-Kanälen aus Abb. 33B als gestrichelte Linie übernommen. Die IC_{50} -Werte lagen mit $8,4 \pm 1,7 \mu\text{M}$ für SUR2A/Kir6.2-Kanäle (●) sowie $11 \pm 0,5 \mu\text{M}$ für SUR2B/Kir6.2-Kanäle (○) etwa um den Faktor 5 niedriger als die K_D -Werte für die Bindung an den entsprechen den SUR2-Isoformen; die Verschiebung wird durch die Pfeile in Teil A der Abbildung symbolisiert.

5 DISKUSSION

5.1 Aktivierung des K_{ATP} -Kanals induziert einen niederaffinen Zustand gegenüber inhibitorischen Nukleosidtriphosphaten

5.1.1 GDP reduziert die ATP-Empfindlichkeit der inhibitorischen Bindungsstelle

Das definierende Charakteristikum des K_{ATP} -Kanals ist die Hemmung seiner Aktivität durch einen Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration. Die inhibitorische Nukleotidbindungsstelle auf Kir6.2 besitzt in Abwesenheit weiterer zytosolischer Nukleotide eine relativ hohe Empfindlichkeit gegenüber ATP. An isolierten „Inside-out“-Patchen wurde in Gegenwart von einer physiologischen freien Mg^{2+} -Konzentration (s. 3.4.3.3) eine halbmaximal inhibitorische ATP-Konzentration von $13,6\mu M$ (s. 4.1.1) gemessen. Eine ähnliche Potenz von ungefähr $10\mu M$ wurde auch bereits 1985 von RORSMAN und TRUBE beschrieben. Im Gegensatz dazu ergaben Schätzungen der ATP-Empfindlichkeit der Kanäle an intakten B-Zellen einen IC_{50} -Wert von etwa $1mM$ (SCHMID-ANTOMARCHI et al., 1987). Diese Abweichung wird mit der Anwesenheit weiterer intrazellulärer Substanzen erklärt, welche die ATP-Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle in intakten Zellen reduzieren, aber beim Herauszipfen des Membranstückes im Rahmen der Patch-Clamp-Untersuchungen durch die Badlösung abgewaschen und dadurch entfernt werden. Um den Mechanismus der Interaktion zwischen aktivierenden Nukleosiddiphosphaten und inhibitorischem ATP genauer zu analysieren, wurde die ATP-Empfindlichkeit rekombinanter SUR1/Kir6.2-Kanäle in Gegenwart steigender Konzentrationen von MgGDP ermittelt. Erstaunlicherweise kam es mit steigender GDP-Konzentration zu einer signifikanten Abnahme der inhibitorischen Potenz von ATP, wobei sich diese allerdings nicht beliebig weit reduzieren ließ, sondern gegen einen Grenzwert lief. So wurde in Gegenwart unphysiologisch hoher, millimolarer Konzentrationen von MgGDP ein maximaler IC_{50} -Wert von ungefähr $450\mu M$ (s. 4.1.1) erreicht. Offensichtlich versetzen aktivierende Nukleosiddiphosphate den K_{ATP} -Kanal in einen Zustand mit niedriger Affinität für inhibitorisches ATP.

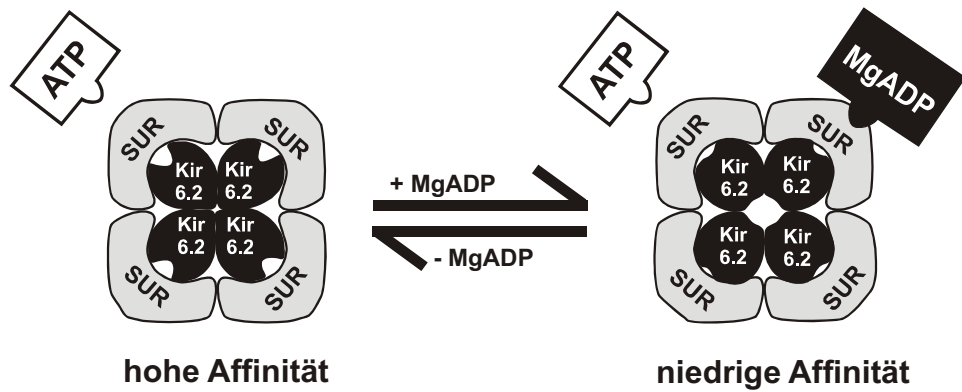


Abb. 35 Affinität der inhibitorischen Nukleotidbindungsstelle auf Kir6.2.

Während der geschlossene Kanal hohe Affinität gegenüber ATP zeigt, wird durch aktivierende Nukleosiddiphosphate ein niederaffiner Zustand induziert, hier symbolisiert durch ein Verschwinden der ATP-Bindungs tasche.

5.1.2 Stöchiometrie der ATP-Wirkung im niederaffinen Zustand

Da am Aufbau eines funktionsfähigen K_{ATP} -Kanals vier Kir6.2-Untereinheiten beteiligt sind (s. 1.1.1), ergeben sich bei Koexpression von zwei Isoformen mit unterschiedlicher Affinität bei zufälliger Verteilung insgesamt 16 unterschiedliche Kanaltypen, die 5 Klassen zugeordnet werden können, nämlich solche mit vier, drei, zwei, einer oder keiner hochaffinen ATP-Bindungsstelle (GROSS, 2000; MARKWORTH et al., 2000; MARKWORTH, 2001; s. Abb. 36). Im Falle der 1:1-Koexpression von hochaffinen Kir6.2_{wt}- und niederaffinen Kir6.2_{G334D}-Untereinheiten verfügen 6,25% der resultierenden Mischkanäle über vier, 25% über drei, 37,5% über zwei, 25% über eine und 6,25% über keine hochaffine Bindungsstelle.

Kir6.2_{wt} (wt)					
Kir6.2_{G334D} (mt)					
N	1	4	6	4	1
P_K (1:1)	6,25	25	37,5	25	6,25
P_K (1:10)	0,007	0,26	4,02	27,1	68,6

Abb. 36 Verschiedene Typen tetradimerer Mischkanäle aus SUR1 und zufällig verteilten Kir6.2_{wt}- bzw. Kir6.2_{G334D}-Untereinheiten (Abb. in Anlehnung an MARKWORTH et al., 2000 und MARKWORTH, 2001).

Die theoretischen Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung der einzelnen Klassen (P_K) sind in Prozent angegeben und wurden für Kir6.2_{wt}:Kir6.2_{G334D}-cDNA-Verhältnisse von 1:1 und 1:10 anhand der Binomialfunktion (s. 3.5.5) berechnet.

DISKUSSION

Für jede dieser Klassen wurde unter der Modellannahme, dass die Besetzung von mindestens einer, zwei, drei oder vier Bindungsstellen notwendig ist, um die Kanalaktivität zu hemmen, eine theoretische Konzentrationshemmbeziehung konstruiert, wobei die für das jeweilige Modell insgesamt resultierende Kurve dem Integral der 5 Einzelkurven entspricht (Abb. 37). Die zufällige Verteilung der beiden unterschiedlichen Kir6.2-Untereinheiten wurde bereits in einer früheren Untersuchung (MARKWORTH et al., 2000; MARKWORTH, 2001) nachgewiesen.

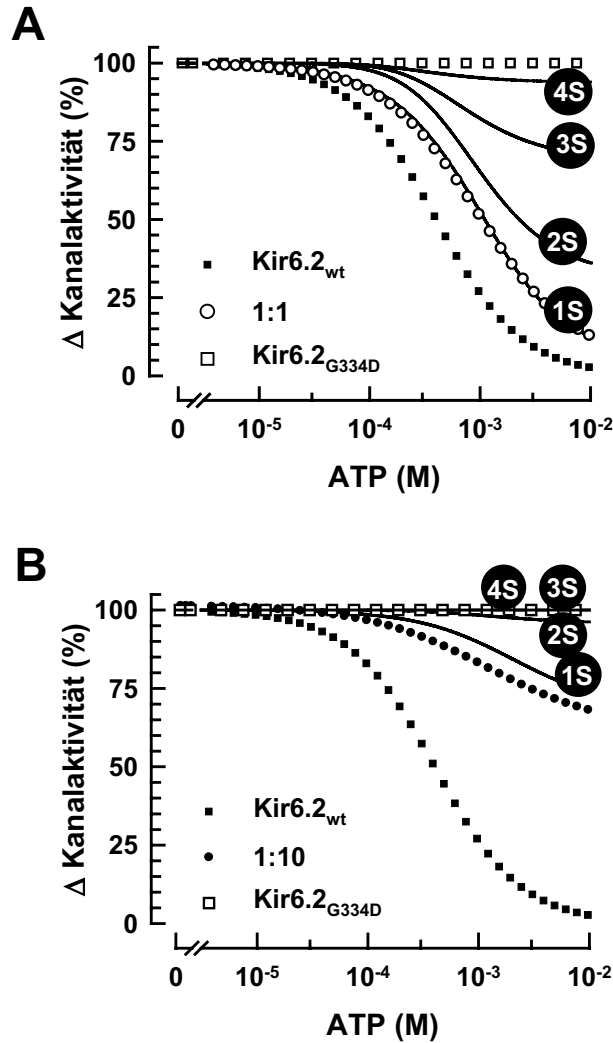


Abb. 37 Stöchiometrie der ATP-induzierten Kanalhemmung in Gegenwart von 1 mM GDP. Die theoretischen Konzentrationshemmkurven wurden unter folgenden Annahmen konstruiert: 1.) Ein Kir6.2_{wt}:Kir6.2_{G334D}-cDNA-Verhältnis von 1:1 (A) bzw. 1:10 (B) resultiert in einer Verteilung der Mischkanaltypen wie in Abb. 36 dargestellt. 2.) Die gleichzeitige Besetzung von einer (1S), zwei (2S), drei (3S) beliebigen oder allen vier (4S) Bindungsstellen induziert eine Hemmung der Kanalaktivität. Die Berechnung der theoretischen Hemmkurven wurde mit Hilfe der unter 3.5.6 beschriebenen Gleichungen (9)–(12) vorgenommen. Die theoretischen Kurven entsprechen der Summe der 5 Hemmkurven für die in Abb. 36 dargestellten Mischkanaltypen (s. auch MARKWORTH et al., 2000; MARKWORTH, 2001). Zum Vergleich wurden die gemessenen Konzentrationshemmkurven (Kir6.2_{wt}, ■; 1:1-cDNA-Verhältnis, ○; 1:10-cDNA-Verhältnis, ●; Kir6.2_{G334D}, □) aus Abb. 13B übernommen.

DISKUSSION

Im Falle des Ein-Bindungsstellen-Modells, d. h. unter der Annahme, dass auch in Gegenwart aktivierender Nukleosiddiphosphate die Besetzung einer einzigen inhibitorischen Bindungsstelle durch ATP ausreicht, um die Kanalaktivität zu hemmen, wäre zu erwarten, dass der Kanal durch hohe Konzentrationen von ATP nur dann nicht geschlossen werden kann, wenn keine hochaffine Untereinheit vorhanden ist (Kanaltyp „0wt 4mt“ in Abb. 36). Bei einem cDNA-Verhältnis der Kir6.2_{wt}- zur Kir6.2_{G334D}-Untereinheit von 1:1 dürften sich folglich etwa 6% der Kanalaktivität, bei einem Verhältnis von 1:10 etwa 70% der Kanalaktivität nicht durch ATP unterdrücken lassen. Ein Vergleich der konstruierten Kurven mit den gemessenen ergab für beide Konzentrationsverhältnisse eine gute Übereinstimmung mit der konstruierten Kurve für das Ein-Bindungsstellen-Modell, während die theoretischen Verläufe der übrigen Modelle deutlich von den gemessenen Kurven abwichen. Ganz besonders gut erkennbar ist dies für das cDNA-Verhältnis 1:10, bei dem im Fall des Zwei-, Drei-, oder Vier-Bindungsstellen-Modells nur eine äußerst geringe Hemmung der Kanalaktivität hätte beobachtet werden dürfen. Wie für das Ein-Bindungsstellen-Modell zu erwarten, lagen die halbmaximal wirksamen ATP-Konzentrationen in Gegenwart von 1 mM GDP für die 1:1-Koexpression etwa um den Faktor 2 sowie für die 1:10-Koexpression etwa um den Faktor 5 rechts von der Wildtypkurve und es wurden ca. 90% (1:1) bzw. 35% (1:10) der Kanalaktivität blockiert. Die Befunde sind ein klares Indiz dafür, dass die Aktivierung durch Nukleosiddiphosphate die Stöchiometrie der ATP-induzierten Hemmung der Kanalaktivität nicht verändert. Auch dann, wenn die inhibitorische ATP-Bindungsstelle auf Kir6.2 durch Aktivierung des Kanals in einen niederaffinen Zustand versetzt ist, gilt, dass die Besetzung einer einzigen von vier funktionell identischen Bindungsstellen ausreicht, um die Offenwahrscheinlichkeit vollständig zu unterdrücken.

5.1.3 Niederaffiner Zustand als Folge der erhöhten Offenwahrscheinlichkeit

Da GDP unter unseren Versuchsbedingungen (0,7 mM freie Mg^{2+} -Ionen) nur zu 45% als Mg^{2+} -Komplex vorliegt, wäre es denkbar, dass freies GDP ähnlich wie freies ADP mit ATP um die inhibitorische Bindungsstelle auf Kir6.2 konkurriert. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die hemmende Wirkung von GDP auf K_{ATP} -Kanäle untersucht. Die halbmaximal inhibitorische GDP-Konzentration lag bei 7 mM. Damit wäre nach CHENG und PRUSSOW (s. 3.5.2.3) in Gegenwart von 1 mM GDP eine Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrationshemmkurve von 13,6 μ M auf 15,5 μ M zur erwarten, nicht aber auf mehr als 400 μ M. Unvereinbar mit einer kompetitiven Interaktion zwischen ATP und GDP an der inhibitorischen Bindungsstelle auf Kir6.2 ist ferner der Befund, dass die halbmaximal inhibitorische ATP-Kon-

DISKUSSION

zentration mit steigender GDP-Konzentration nicht linear zunimmt, sondern nach steilem Anstieg im Bereich niedriger Konzentrationen asymptotisch ein Maximum erreicht (s. Abb. 38).

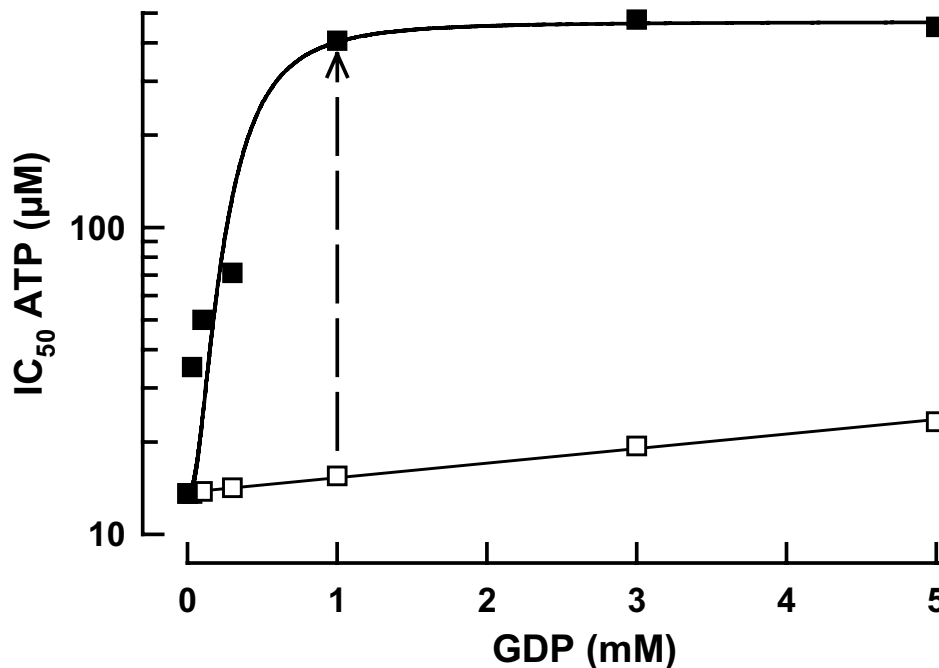


Abb. 38 Die Reduktion der ATP-Empfindlichkeit durch GDP beruht nicht auf einer kompetitiven Interaktion.

Aufgetragen sind die IC_{50} -Werte für ATP in Gegenwart steigender GDP-Konzentrationen. Die Messwerte (■) sind Abb. 12C entnommen (s. 4.1.1). Der unter der Annahme einer kompetitiven Wechselwirkung von GDP und ATP an der inhibitorischen Bindungsstelle auf Kir6.2 zu erwartende Kurvenverlauf wurde gemäß CHENG und PRUSSOW errechnet (s. 3.5.2.3; □). Dabei wurde eine halbmaximal inhibitorische GDP-Konzentration von 7 mM angenommen (s. 4.1.3, Abb. 14).

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass Nukleosiddiphosphate den Kanal durch ihren aktivierenden Effekt in einen Zustand mit niedriger Affinität für ATP überführen, was bedeutet, dass die Affinität der inhibitorischen Nukleotidbindungsstelle auf Kir6.2 durch „Gating“ (Vorgang des Öffnens und Schließens der K_{ATP} -Kanalpore) kontrolliert wird. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht, dass sich das Muster der Empfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Nukleotiden in Gegenwart maximal aktivierender GDP-Konzentrationen nicht ändert (s. 4.1.5, Abb. 18). Darüber hinaus wird diese These dadurch gestützt, dass der niederaffine Zustand nicht nur durch aktivierende Nukleosiddiphosphate erzeugt werden konnte, sondern auch durch Mutationen im Bereich des Kir6.2, die eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit hervorrufen. Dies war z. B. beim Austausch des Cystein in Position 166 gegen Serin der Fall. Möglicherweise ist C166 durch seine Lage im Bereich der Pore – am zytosolischen Ende der zweiten transmembranären Domäne – unmittelbar am „Gating“ der K_{ATP} -Kanäle beteiligt,

DISKUSSION

welches den Durchfluss durch die Kanalpore reguliert und den langen Geschlossenzustand („interburst closed state“) des Kanals steuert (TRAPP et al., 1998). SUR1/Kir6.2_{C166S}-mutante Kanäle fielen auch in Abwesenheit von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten nur sehr selten in den langen Geschlossenzustand (TRAPP et al., 1998). Sie ließen sich durch ATP schließen, allerdings lag der IC₅₀-Wert für die Hemmung der Kanalaktivität bei 700 µM (s. 4.1.4, Abb. 15) und damit ähnlich wie bei den durch Nukleosiddiphosphate maximal geöffneten Kanälen deutlich rechts vom IC₅₀-Wert für reine Wildtyp-Kanäle. Untersuchungen an Mischkanälen aus Wildtyp- und mutanten G334D-C166S-Kir6.2-Untereinheiten zeigen, dass diese Rechtsverschiebung nicht über eine Beeinflussung der ATP-Bindung zustande kommt, sondern vermutlich auf einem mutationsbedingten veränderten „Gating“ beruht. Wäre für die Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrationshemmkurve eine verminderte ATP-Bindung der C166S-mutanten Kanäle verantwortlich, dann sollte das zusätzliche Einführen von C166S in G334D-mutante Untereinheiten¹² keinen Einfluss auf die bei Koexpression von C166S-G334D:wt im Verhältnis 1:1 resultierenden Mischkanäle ausüben. Das Gegenteil ist aber der Fall. Während die G334D-Wildtyp-Mischkanäle durch 25 µM ATP halbmaximal geschlossen werden konnten (MARKWORTH et al., 2000), lag der IC₅₀-Wert für die Hemmung der Kanalaktivität der Mischkanäle aus G334D-C166S- und Wildtyp-Kir6.2-Untereinheiten bei 300 µM (s. 4.1.4, Abb. 16) und damit um mehr als den Faktor 10 rechts von dem Wert, der unter diesen Bedingungen ohne die Mutation C166S beobachtet wurde. Der Befund zeigt, dass C166S die ATP-Empfindlichkeit der koexprimierten Wildtyp-Untereinheit durch seinen Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle beeinflusst und belegt damit eine kooperative Interaktion der Untereinheiten bei dieser Form des „Gating“. Interessanterweise ließen sich aber auch die bei Koexpression von C166S-G334D und dem Wildtyp im Verhältnis 1:1 resultierenden Mischkanäle zu mehr als 90% schließen. Das bedeutet, dass das Besetzen einer hochaffinen Wildtyp-Untereinheit durch inhibitorisches ATP ausreicht, um die Kanalaktivität zu unterdrücken und zeigt darüber hinaus, dass die Kanäle auch dann geschlossen werden können, wenn sie neben der Wildtyp-Untereinheit aus bis zu drei Untereinheiten mit zusätzlichem C166S bestehen, also aus Untereinheiten, die wahrscheinlich nicht spontan in den langen Geschlossenzustand wechseln. Die Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit bei diesen Mischkanälen unterscheidet sich von der Hemmung bei reinen Wildtyp-Kanälen allerdings dadurch, dass wesentlich höhere ATP-Konzentrationen erforderlich sind. Die mutanten Untereinheiten verhindern also anscheinend, dass die Wildtyp-Untereinheiten den „typischen“ – auf Kooperativität der vier Kir6.2-Untereinheiten beruhenden – Geschlossenzustand einnehmen

¹² G334D-mutante Kanäle sind ATP-unempfindlich; vermutlich ist das Glycin in Position 334 direkt oder indirekt an der ATP-Bindung beteiligt (LI et al., 2000).

DISKUSSION

können, der mit einer hohen Affinität für ATP verbunden ist. Die niedrige ATP-Sensitivität der Mischkanäle ist damit klares Indiz dafür, dass sich der ATP-induzierte Geschlossen-stand qualitativ von dem der reinen Wildtyp-Kanäle unterscheidet.

ATP reguliert den Kanal daher offenbar über zwei verschiedene „Gating“-Mechanismen: Während bei niedriger Offenwahrscheinlichkeit und hoher ATP-Empfindlichkeit alle vier Kir6.2-Untereinheiten gemeinsam als kooperative Einheit funktionieren und wahrscheinlich in einer Art „Blendenmechanismus“ durch Seitwärts- oder Drehbewegungen der transmembranären Helices am „Gating“ beteiligt sind, überführt maximale Aktivierung die Kanäle in einen Zustand mit niedriger Affinität für ATP, bei dem die porenblockierende, durch ATP stabilisierte Konformation vermutlich auf die Untereinheit des Kanalkomplexes beschränkt bleibt, die durch ATP besetzt ist.

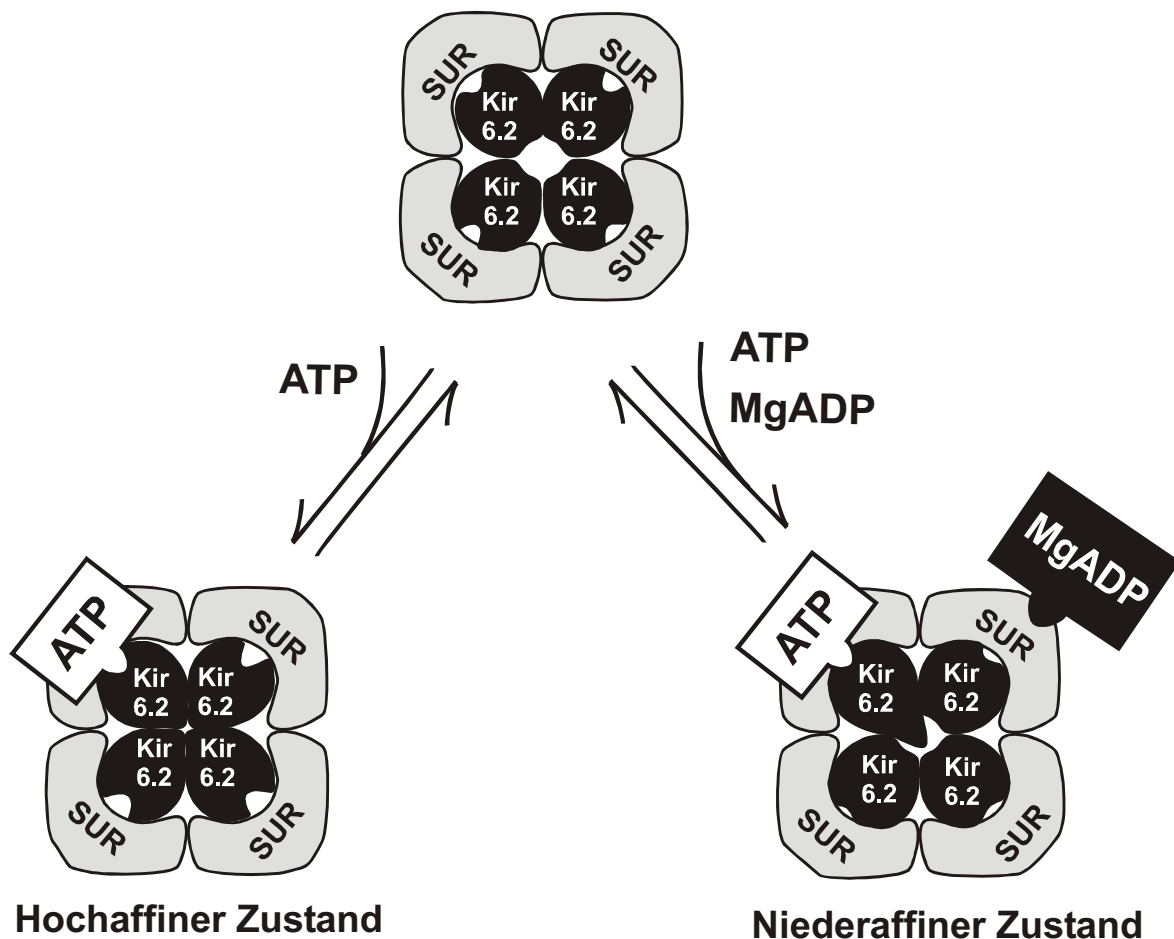


Abb. 39 Die ATP-induzierte Kanalthemmung basiert wahrscheinlich auf zwei unterschiedlichen „Gating“-Mechanismen.

Während im hochaffinen Zustand alle vier Kir6.2-Untereinheiten gemeinsam als kooperative Einheit am „Gating“-Mechanismus mitwirken, überführt maximale Aktivierung die Kanäle in einen Zustand mit niedriger Affinität gegenüber ATP, bei dem der Verschluss der Kanalpore durch die Untereinheit bewerkstelligt wird, die durch ATP besetzt ist.

5.1.4 Physiologische Relevanz der Affinitätsverschiebung

Die zytosolischen Konzentrationen von ADP und ATP in der B-Zelle liegen vermutlich im Bereich von 0,3–1,2mM bzw. 0,6–3mM (MALAISSE und SENER, 1987; DETIMARY et al., 1998; KENNEDY et al., 1999; GRIBBLE et al., 2000). Unter diesen Bedingungen sollte ein Teil der K_{ATP} -Kanäle in der Plasmamembran in dem durch Nukleosiddiphosphate induzierten geöffneten Zustand vorliegen. Diese Kanäle befinden sich nun entsprechend unserer Modellvorstellung im niederaffinen Zustand der inhibitorischen ATP-Bindungsstelle auf Kir6.2 und ihre Offenwahrscheinlichkeit würde demnach sowohl durch Variation der ADP als auch der ATP-Konzentration im physiologischen Konzentrationsbereich gesteuert. Die nicht durch ADP aktivierten Kanäle befänden sich hingegen im Zustand hoher Affinität gegenüber inhibitorischem ATP, sodass sie bei physiologischen ATP-Konzentrationen komplett geschlossen wären. Der Wechsel zwischen dem hoch- und niederaffinen Status der ATP-Bindungsstelle auf Kir6.2 wäre somit Voraussetzung für die Regulation der Kanalaktivität durch die physiologische Variation der zytosolischen Konzentrationen von ADP und ATP.

5.2 E23K sensibilisiert die K_{ATP} -Kanäle der B-Zelle gegenüber der Wirkung aktivierender Nukleosiddiphosphate

Der häufig vorkommende Polymorphismus E23K in der Kir6.2-Untereinheit nimmt deutlichen Einfluss auf das „Gating“ der K_{ATP} -Kanäle der pankreatischen B-Zelle, indem er die Zeitspanne, die der Kanal normalerweise im langen Geschlossenzustand („interburst closed state“) verbleibt, signifikant reduziert. In Verbindung mit einer Abnahme der ATP-Empfindlichkeit resultiert daraus ein merklicher Anstieg der spontanen Offenwahrscheinlichkeit (SCHWANSTECHE et al., 2002). In dieser Studie wurden die Auswirkungen von E23K auf die Kanaleigenschaften in Gegenwart von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass E23K die Empfindlichkeit der K_{ATP} -Kanäle der B-Zelle gegenüber ATP vermindert und sie zugleich für eine Aktivierung durch Nukleosiddiphosphate sensibilisiert. Die Experimente wurden bei gleichzeitiger Anwesenheit von aktivierenden und inhibitorischen Nukleotiden durchgeführt, da in intakten Zellen beide Arten von Nukleotiden in einer komplexen Art und Weise in die Regulation der Kanalaktivität involviert sind. Bisher ist allerdings ungeklärt, welcher der beiden Effekte für die Kontrolle der Insulinsekretion physiologisch relevant ist, die Hemmung der Kanalaktivität durch Interaktion der Nukleotide mit ihrer Bindungsstelle auf Kir6.2 oder die Kanalöffnung über Bindung an die SUR1-Untereinheit oder beide gemeinsam. Übereinstimmend mit der Vorstellung, dass die

DISKUSSION

Steuerung der Insulinfreisetzung durch das zytosolische ATP/ADP-Konzentrationsverhältnis erfolgt (DETIMARY et al., 1998), spricht einiges für eine kombinierte Beteiligung beider Bindungsstellen: 1.) In ruhenden pankreatischen B-Zellen liegt die geschätzte zytosolische ATP-Konzentration zwischen 0,6 und 3 mM (MALAISSE und SENER, 1987; DETIMARY et al., 1998; KENNEDY et al., 1999; GRIBBLE et al., 2000) und die von ADP bei 0,3–1,2 mM (MALAISSE und SENER, 1987; DETIMARY et al., 1998). In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (DUNNE et al., 1988) wiesen unsere Versuche eine Modulation der Kanalaktivität auf, wenn in 0,3 mM GDP die ATP-Konzentration um 1 mM variierte (s. 4.2.1, Abb. 20A) und umgekehrt in 1 mM ATP die GDP-Konzentration um 0,3 mM fluktuierte (s. 4.2.2, Abb. 22A). Folglich scheint die Annahme plausibel, dass beide sowohl die hemmende als auch die aktivierende Nukleotidbindungsstelle an der physiologischen Kontrolle der Kanalaktivität beteiligt sind. Daher resultieren bei einem Verlust der aktivierenden Wirkung von Nukleosiddiphosphaten dauerhaft geschlossene Kanäle und eine Insulinhypersekretion trotz einer bestehenden ausgeprägten Hypoglykämie, wie sie beim Krankheitsbild der „Persistierenden Hyperinsulinämischen Hypoglykämie des Kleinkindes (PHHI)“ beobachtet werden kann (AGUILAR-BRYAN et al., 1998; AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999). Die Bedeutung der inhibitorischen Bindungsstelle wird auf der anderen Seite unterstrichen durch die Beobachtung, dass bereits eine geringe Reduktion der ATP-Empfindlichkeit um nicht mehr als das 3,6fache einen schweren neonatalen Diabetes in transgenen Mäusen hervorruft (KOSTER et al., 2000). Demzufolge sind vermutlich beide Effekte von E23K physiologisch relevant, sowohl die reduzierte ATP-Empfindlichkeit als auch die erhöhte Potenz der Nukleosiddiphosphate.

Welchen Zusammenhang gibt es nun zwischen der anfänglichen Beobachtung einer erhöhten spontanen Offenwahrscheinlichkeit (SCHWANSTECHEER et al., 2002) und diesen Wirkungen? In Abwesenheit von Nukleotiden verringert E23K die Zeit, die der Kanal im langen Geschlossenzustand verbringt, indem deren Frequenz und mittlere Dauer verändert wird (SCHWANSTECHEER et al., 2002). Damit scheint das Gleichgewicht zwischen den langen Geschlossenzeiten und den „Burstzeiten“ (Burst: Offenzustand mit kurzen Geschlossenzuständen) zum Letzteren hin verschoben und zwar, indem die „Burstphase“ stabilisiert und der lange Geschlossenzustand („interburst closed state“) destabilisiert werden. Interessanterweise wurden vergleichbare Verschiebungen bei der Nukleosiddiphosphat-induzierten Kanalaktivierung beobachtet (BRANSTROM et al., 1997), was den Schluss nahe legt, dass E23K seine Wirkung vermittelt, indem es den Konformationswechsel erleichtert, der bei der physiologischen Regulation der Kanalaktivität aus der Wechselwirkung der SUR- und Kir-Untereinheiten resultiert. Auf der Grundlage der Kanalkinetik wäre demzufolge zu erwarten,

DISKUSSION

dass E23K die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Besetzung der Bindungsstelle für aktivierende Nukleosiddiphosphate auf SUR eine Kanalöffnung verursacht und damit eine Linksverschiebung der Konzentrationsaktivierungskurve induziert.

Im Gegensatz zu den Nukleosiddiphosphaten beeinflusst ATP nicht die „Burstdauer“, sondern erhöht stattdessen nur die mittlere Zeit, die sich der Kanal im langen Geschlossenzustand („interburst closed state“) befindet (ENKVETCHAKUL et al., 2000; ENKVETCHAKUL et al., 2001), was dafür spricht, dass ATP ausschließlich an diesen Zustand bindet. Die E23K-induzierte Verringerung der Zeit, die sich der Kanal im langen Geschlossenzustand befindet, sollte daher zu einer Reduktion der Wahrscheinlichkeit führen, dass ATP die inhibitorische Bindungsstelle auf Kir6.2 besetzt. Höhere ATP-Konzentrationen sollten diesen Effekt durch eine beschleunigte Assoziation kompensieren, sodass E23K eine Rechtsverschiebung der Konzentrationshemmkurve hervorrufen sollte. Die Wirkungen des Polymorphismus auf die spontane Kanalkinetik (SCHWANSTECHER et al., 2002) scheinen daher mit den in dieser Studie beobachteten Veränderungen der Nukleotidempfindlichkeiten gut vereinbar zu sein.

In pankreatischen B-Zellen ist eine beträchtliche Nukleosiddiphosphatkinase(NDPK)-Aktivität nachgewiesen worden (KOWLURU und METZ, 1994). Insbesondere die Wirkung von GDP auf die Glibenclamid-Bindung an solubilisierten B-Zellmembranen (SCHWANSTECHER et al., 1991b; SCHWANSTECHER et al., 1992d) lässt darauf schließen, dass dies Enzym eng mit den K_{ATP} -Kanälen der pankreatischen B-Zelle verknüpft ist. Aus diesem Grund könnte die NDPK-Aktivität auch bei isolierten Patchen zu einer Verzerrung der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse geführt haben. Allerdings gibt es eindeutige Argumente gegen diese Hypothese: 1.) Die Hill-Koeffizienten der Konzentrationshemmkurven für ATP in Gegenwart von GDP liegen bei 1,22 für Wildtyp- bzw. 1,34 für E23K-Kanäle (s. 4.2.1, Abb. 20), was mit den für ein ADP-freies Medium erwarteten Werten übereinstimmt (MARKWORTH et al., 2000). 2.) Eine grobe Abschätzung ergibt, dass bei schneller und direkter Applikation der Testmedien (s. 3.4.3.4) enzymatisch gebildete Nukleotide (ADP oder GTP) am isolierten Patch zu keinem Zeitpunkt höhere Konzentrationen als 0,1% der Eduktkonzentrationen (ATP oder GDP) erreichen.

Folglich verschiebt E23K das spontane Gleichgewicht zwischen offenem und geschlossenem Status in Richtung Offenzustand. Daraus resultiert eine entgegengesetzte Änderung der Empfindlichkeiten für inhibitorische und aktivierende Nukleotide. Während die Empfindlichkeit gegenüber einer Hemmung durch ATP leicht sinkt, wird die Empfindlichkeit für eine Aktivierung durch MgGDP diskret erhöht. Dies gilt, wenn beide Nukleotide in physiologischen Konzentrationen vorliegen.

DISKUSSION

Somit ist für E23K-mutante Kanäle auch in der intakten B-Zelle eine leicht erhöhte Offenwahrscheinlichkeit zu erwarten, damit eine diskrete Hyperpolarisation der Plasmamembran und eine leichte Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms. Dies führt offenbar in der B-Zelle des Pankreas zu einer diskreten Hemmung der Freisetzung von Insulin (NIELSEN et al., 2003) und damit zu dem in den Assoziationsstudien beobachteten erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes (SCHWANSTECHEr und SCHWANSTECHEr, 2002; BARROSO et al., 2003; GLOYN et al., 2003; LOVE-GREGORY et al., 2003).

5.3 Vorüberlegungen zur Erzeugung einer transgenen Maus als Träger des E23K-Polymorphismus

Experimente an transient transfizierten COS-Zellen belegen für K_{ATP} -Kanäle mit dem Polymorphismus E23K in der Kir6.2-Untereinheit im Vergleich zu reinen Wildtyp-Kanälen eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber ATP (SCHWANSTECHEr et al., 2002). Für die Beurteilung der Konsequenzen dieser diskreten Veränderung auf Glucose-Homöostase und andere Körperfunktionen sowie die Analyse homozygoter und heterozygoter Auswirkungen fehlt allerdings bisher ein geeignetes Tiermodell. Das Einbringen des Polymorphismus E23K in ein Mausgenom ist entweder über eine ungerichtete Integration der fremden genetischen Information nach dem Zufallsprinzip oder über ein präzises Dirigieren zum endogenen Zielgen durch homologe Sequenzen möglich. Zufällige Integration der exogenen DNA birgt dabei jedoch die Gefahr, dass ein essenzielles Gen getroffen und so in seiner Funktion bzw. Regulation beeinträchtigt wird. Neben einer unvorhersehbaren Kopienzahl pro Zelle könnte ferner in Abhängigkeit von der jeweiligen Positionierung des Transgens im Genom die Transkription in den verschiedenen Körpergeweben und Entwicklungsstadien variieren und unerwartete Effekte hervorrufen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde das Verfahren der homologen Rekombination ausgewählt. Beim Rekombinationsvorgang wird unter Nutzung normaler zellulärer „Cross-over“-Prozesse ein modifiziertes Gen reziprok gegen sein chromosomales Äquivalent ausgetauscht. Dabei ergeben sich offenbar signifikant höhere Targeting-Frequenzen, wenn die DNA zur Vektorkonstruktion und die Zellen mit dem Zielgen aus demselben Mausstamm gewonnen werden (TE RIELE et al., 1992; VAN DEURSEN und WIERINGA, 1992; DENG und CAPECCHI, 1992). In der Literatur kommen vielfach embryonale Stammzellen (ES-Zellen) vom Mausstamm 129/Sv oder eng verwandten Stämmen wie 129/Ola oder 129/Ev zur Anwendung (BISHOP, 1999), so dass eine isogene DNA-Bibliothek basierend auf dem Genom einer 129/Ola-Maus für die Isolierung der genomischen Kir6.2-DNA ausgewählt

DISKUSSION

wurde. Da solche Rekombinationsereignisse im Gegensatz zur zufälligen Integration an einer beliebigen Stelle insgesamt nur sehr selten vorkommen (in einer von 10^5 – 10^9 Zellen; SCHENKEL, 1995) und sich der Polymorphismus E23K selbst nur ungenügend zur Selektion eignet, stand bei der Vektorkonstruktion vor allem die Entwicklung und Optimierung geeigneter Screening-Methoden im Vordergrund, um die wenigen stabil und in gewünschter Weise transfizierten Zellen identifizieren zu können. Die erste Auswahl der Zellen nach der Transfektion mit dem Konstrukt sollte dabei über die *loxP*-flankierte *Neo*-Kassette als positivem Selektionsmarker erfolgen, während im weiteren Vorgehen die eigentliche Lokalisation des Transgens auf Untersuchungen mittels PCR und Southern Blot basiert. Ist die Unterbrechung einer codierenden Region durch einen Selektionsmarker bei „Knock-out“-Experimenten durchaus erwünscht, ergibt sich bei „Knock-in“-Verfahren das Problem von potenziellen Interferenzen zwischen exogenen Promotor- und Verstärkersequenzen mit endogenen regulatorischen Elementen, die sich in der Umgebung des Zielgens befinden. Zur Vermeidung dieser unkalkulierbaren Wechselwirkungen ist nach erfolgreichem Abschluss der Screening-Untersuchungen eine nahezu vollständige Entfernung des Selektionsmarkers unter Einwirkung der *Cre*-Rekombinase geplant. Dabei ist unbekannt, ob die verbleibenden 50bp Fremd-DNA die Genfunktion selbst beeinflussen. Das Kir6.2-Gen weist anstelle der charakteristischen TATA-Box als klassischem Promotorelement vor dem Startcodon eine Region auf, die reich an den Basen Guanin und Cytosin ist. Untersuchungen von ASHFIELD und ASHCROFT am humanen Kir6.2 (1998) lassen jedoch vermuten, dass die dem Kir6.2 vorangehenden ca. 1000 Basen noch für die Expression benötigt und auf keinen Fall durch einen eingebauten Selektionsmarker gestört werden sollten. Darüber hinaus mangelt es dem Gen an langen Introns, sodass nur der Bereich hinter dem Stopcodon des Kir6.2 für die Integration der *Neo*-Kassette in Frage kam. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch in diesem Fall für die Expression bedeutsame Kontrollelemente oder das PolyA-Signal beeinträchtigt werden, ist zur Abklärung die Erzeugung eines Kontrollstammes mit den verbleibenden Überresten der Selektionskassette aber ohne den E23K-Polymorphismus zu erwägen.

Für die Vektorkonstruktion standen drei Cosmid-Klone mit der genomischen DNA des Kir6.2 zur Verfügung, wobei C2 vermutlich nicht die komplette Gensequenz enthielt, da trotz eines positiven Hybridisierungsnachweises die PCR-Kontrolle negativ ausfiel (s. 4.3.3 und 4.3.4). Aus dem Cosmid-Klon 1 (C1) wurde schließlich ein geeignetes Fragment isoliert und sequenziert, an dem der Basenaustausch für den Polymorphismus E23K vorgenommen wurde. Das Ende vom SUR1-Gen wurde aus dem Konstrukt entfernt, um das Risiko einer Funktionsstörung der regulatorischen Untereinheit des K_{ATP} -Kanals zu minimieren. Unter Berück-

sichtigung der Kriterien für ein PCR-Screening (TORRES und KÜHN, 1997) wurde die Selektionskassette asymmetrisch in das ausgewählte Fragment eingesetzt, so dass sich ein kurzer homologer Arm von ungefähr 1,5 kb für die PCR-Reaktion und ein langer homologer Arm von etwa 6 kb mit dem modifizierten Kir6.2-Gen ausbildete (s. auch 4.3.7, Abb. 28).

Bei der homologen Rekombination werden Selektionsmarker und die Mutation nicht automatisch kotransferiert, woraus ES-Zell-Klone mit Resistenzmarker, aber ohne Mutation bzw. mit modifiziertem Zielgen ohne Selektionsmarker resultieren können. Die Anzahl falsch positiver ES-Zell-Klone und damit der Screening-Aufwand steigen mit zunehmendem Abstand zwischen Selektionskassette und modifiziertem Genabschnitt (TORRES und KÜHN, 1997). Da beide in dem Konstrukt jedoch nur durch eine homologe Basensequenz von etwa 1,1 kb separiert werden, ist es eher unwahrscheinlich, dass sich die Rekombinationsbruchstelle zwischen den Elementen befindet. Die Gesamtlänge des Konstruktes beträgt ca. 8,7kb und bewegt sich damit in einem Bereich von 5–10kb (SCHENKEL, 1995), der bereits die Bedingungen für eine relativ gute Integrationsfrequenz bei ausreichender Stabilität und Transfektionseffizienz erfüllen sollte. Die Überprüfung des Vektors auf seine Funktionsfähigkeit mit embryonalen Stammzellen steht noch aus.

5.4 Gewebselektivität von Nateglinid

5.4.1 Nateglinid ist voller Agonist an der Sulfonylharnstoffbindungsstelle humaner K_{ATP} -Kanäle

Die Glinide oder „prandialen Glucoseregulatoren“, eine neue Gruppe oraler Antidiabetika, stimulieren die Insulinsekretion aus den B-Zellen des Pankreas, obwohl in ihrer chemischen Struktur die klassische Sulfonylharnstoffgruppe fehlt.

Die Verdrängungsbindungskurven für Nateglinid an den SUR-Isoformen waren monophasisch und hatten Hill-Koeffizienten dicht bei eins, was ein Indiz dafür ist, dass Nateglinid seine Wirkung durch Interaktion mit einer einzigen nicht-kooperativen Bindungsstelle auf der SUR-Untereinheit entfaltet. Nateglinid kann [3H]Glibenclamid aus seiner Bindung an den SUR1 auch in Abwesenheit von MgATP vollständig verdrängen. Zusammen mit der Beobachtung, dass Nateglinid die Kinetik der Dissoziation von [3H]Glibenclamid nicht beeinflusst (HU et al., 2000), ist dieser Befund ein klares Indiz dafür, dass es mit derselben hochaffinen Bindungsstelle interagiert, die auch durch Glibenclamid und andere Sulfonylharnstoffe besetzt wird.

DISKUSSION

Ähnlich wie bei den Sulfonylharnstoffen lagen die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Kanalaktivität von SUR1/Kir6.2- und SUR2/Kir6.2-Kanälen durch Nateglinid um den Faktor 4,5–6,1 niedriger als die K_D -Werte für die Bindung der Substanz an die einzelnen SUR-Isoformen. Außerdem waren die Hill-Koeffizienten der Patch-Clamp-Kurven jeweils signifikant größer als 1 (s. Abb. 40). Beides, die Linksverschiebung der IC_{50} -Werte gegenüber den K_D -Werten und auch die größere Steilheit der Konzentrationshemmkurven, steht im Einklang mit unserer früheren Beobachtung, dass die Besetzung einer einzigen der vier Sulfonylharnstoffbindungsstellen pro Kanalkomplex ausreicht, um die Kanäle zu schließen (DÖRSCHNER et al., 1999; s. Abb. 40).

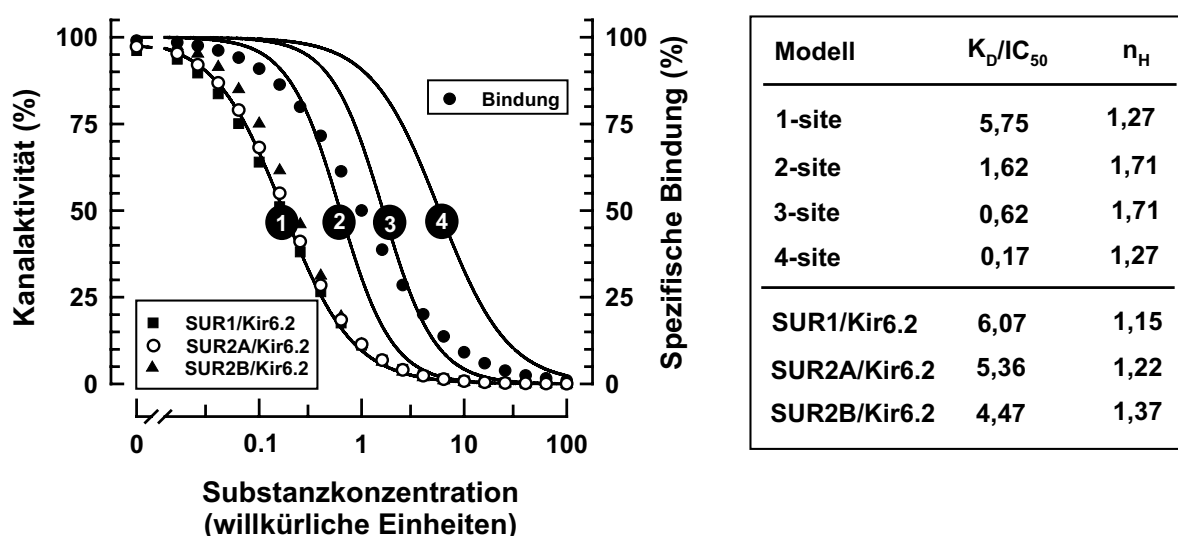


Abb. 40 Modell zur Erklärung der Linksverschiebung der Sensitivität von Nateglinid gegenüber der Affinität der Substanz (Abb. in Anlehnung an DÖRSCHNER, 2000).

Die theoretischen Konzentrationswirkungsbeziehungen wurden unter der Annahme konstruiert, dass 1.) die Bindung nicht kooperativ ist (Hill-Koeffizient=1) und einen K_D von 1 aufweist (willkürliche Einheiten), wobei die entsprechende Kurve durch die geschlossenen Kreise (●) repräsentiert wird (rechte Ordinate) und 2.) der Kanal durch Besetzung von einer (①), zwei (②), drei (③) beliebigen oder allen vier (④) Bindungsstellen pro Kanalkomplex geschlossen wird (s. 3.5.4). Die resultierenden K_D/IC_{50} -Verhältnisse und Hill-Koeffizienten (n_H) betragen: 5,75 und 1,27 für das Ein-Bindungsstellen-Modell (①; „1-site“), 1,62 und 1,71 für das Zwei-Bindungsstellen-Modell (②; „2-site“), 0,62 und 1,71 für das Drei-Bindungsstellen-Modell (③; „3-site“) sowie 0,17 und 1,27 für das Vier-Bindungsstellen-Modell (④; „4-site“) (DÖRSCHNER, 2000). Die arithmetischen Mittelwerte von K_D/IC_{50} -Verhältnis und Hill-Koeffizient des getesteten Nateglinids lagen bei 6,07 und 1,15 (SUR1/Kir6.2), 5,36 und 1,22 (SUR2A/Kir6.2) bzw. 4,47 und 1,37 (SUR2B/Kir6.2). Die aus diesen Daten konstruierten Kurven sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Form von Linien dargestellt, sondern werden für SUR1/Kir6.2 durch geschlossene Quadrate (■), für SUR2A/Kir6.2 durch offene Kreise (○) sowie für SUR2B/Kir6.2 durch geschlossene Dreiecke (▲) symbolisiert.

DISKUSSION

Wie auch für Sulfonylharnstoffe und analoge Substanzen beschrieben, kann Nateglinid die Aktivität von SUR1/Kir6.2- bzw. SUR2/Kir6.2-Kanälen (GRIBBLE et al., 1997b und c; SCHWANSTECHEER et al., 1998; als Übersichtsartikel s. ASHCROFT und GRIBBLE, 1999) an isolierten „Inside-out“-Patches nicht vollständig unterdrücken (s. 5.4.2, Tab. 1). Die maximal induzierbare Hemmung der Kanalaktivität unterscheidet sich dabei nicht von der durch Glibenclamid, Glipizid oder Tolbutamid. Nateglinid wirkt daher als voller Agonist an humanen pankreatischen und kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen.

5.4.2 Nateglinid besitzt hohe Selektivität für die humanen SUR1/Kir6.2-Kanäle der B-Zelle

Die K_D -Werte von Nateglinid für die Bindung an die SUR2-Isoformen (45 bzw. 51 μ M für SUR2A bzw. SUR2B) und auch die IC_{50} -Werte für die Hemmung von SUR2/Kir6.2-Kanälen (8,4 und 11,4 μ M für SUR2A/Kir6.2- bzw. SUR2B/Kir6.2-Kanäle) lagen um mehr als zwei Zehnerpotenzen höher als die für SUR1 ermittelten entsprechenden Werte (0,45 μ M und 74 nM) (s. 4.4.1 und 4.4.2 sowie Tab. 1). Nateglinid zeigt damit hohe Selektivität für die SUR1/Kir6.2-Kanäle der pankreatischen B-Zelle. Die Selektivität dieser Substanz gegenüber den kardiovaskulären SUR2A/Kir6.2- oder SUR2B/Kir6.2-Kanälen (100–150) ist sehr viel ausgeprägter als die von Tolbutamid (15–18) und ähnlich der SUR1/Kir6.2-Selektivität von Glipizid (400–470) und Glibenclamid (500–570) (s. auch Tab. 1).

Eine ausgeprägte Selektivität von Nateglinid für SUR1/Kir6.2-Kanäle ist auch von HU et al. [1999] (Faktor 45–311) und CHACHIN et al. [2003] (Faktor 1400–1480) beschrieben worden. Allerdings lagen die IC_{50} -Werte für die Hemmung der einzelnen Kanalsubtypen in der erstgenannten Studie deutlich höher. Ursache dafür ist wahrscheinlich, dass die Ableitungen in dieser Studie im „Whole-cell“-Modus in Gegenwart maximal wirksamer Konzentrationen der Kaliumkanalöffner Diazoxid bzw. Cromakalim durchgeführt wurden. Da die Bindungsstellen für Sulfonylharnstoffe und Kaliumkanalöffner negativ allosterisch aneinander gekoppelt sind (SCHWANSTECHEER et al., 1990, 1991a und b, 1992a, c, d und e; BRAY und QUAST, 1992; TOMAN, 2001), ist unter diesen Versuchsbedingungen eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrationshemmbeziehungen für Nateglinid zu erwarten.

DISKUSSION

	Glibenclamid	Glipizid	Nateglinid	Tolbutamid
<i>Humaner SUR1/Kir6.2</i>				
K_D	0,55 ± 0,09 nM ^a	13 ± 4 nM ^a	450 ± 31 nM ^b	22 ± 2 μM ^a
IC₅₀	0,09 ± 0,03 nM ^c	3,2 ± 1,1 nM ^c	74 ± 11 nM ^b	5,3 ± 0,6 μM ^c
E_{max} (+ 0,3 mM MgADP)	83 ± 2 % ^c	86 ± 1 % ^c	87 ± 2 % ^b	91 ± 1 % ^c
E_{max}	43 ± 3 % ^c	39 ± 4 % ^c	43 ± 4 % ^b	45 ± 3 % ^c
<i>Humaner SUR2A/Kir6.2</i>				
K_D	0,33 ± 0,04 μM ^c	7,5 ± 0,6 μM ^c	45 ± 2 μM ^b	280 ± 15 μM ^c
IC₅₀	0,051 ± 0,012 μM ^c	1,5 ± 0,2 μM ^c	8,4 ± 1,7 μM ^b	81 ± 6 μM ^c
E_{max}	49 ± 5 % ^c	44 ± 4 % ^c	52 ± 5 % ^b	46 ± 4 % ^c
<i>Humaner SUR2B/Kir6.2</i>				
K_D	0,27 ± 0,04 μM ^a	8 ± 0,4 μM ^a	51 ± 5 μM ^b	310 ± 18 μM ^a
IC₅₀	0,045 ± 0,014 μM ^c	1,3 ± 0,3 μM ^c	11 ± 0,5 μM ^b	93 ± 8 μM ^c
E_{max}	47 ± 4 % ^c	54 ± 6 % ^c	48 ± 5 % ^b	48 ± 5 % ^c
IC_{50(2A/6.2)}/IC_{50(1/6.2)}	567	469	114	15,3
IC_{50(2B/6.2)}/IC_{50(1/6.2)}	500	406	149	17,5

Tab. 1 Affinitäten von Nateglinid und ausgewählten Sulfonylharnstoffen für SUR-Isoformen und Potenzen an rekombinanten humanen SUR1/Kir6.2- und SUR2/Kir6.2-Kanälen.

^a Werte entnommen aus DÖRSCHNER et al., 1999; ^b siehe Ergebnisteil 4.4; ^c SCHWANSTECHER et al., unveröffentlichte Ergebnisse.

Die Verdrängungsbindungsexperimente mit [³H]Glibenclamid am SUR1 bzw. [³H]P1075 am SUR2A oder SUR2B wurden mit Membranen von COS-Zellen durchgeführt, welche die jeweiligen humanen SUR-Isoformen exprimierten (für Details s. 3.3). Die Hemmung der Kanalaktivität wurde in der „Inside-out“- Konfiguration der Patch-Clamp-Technik an COS-Zellen mit rekombinanten humanen SUR1/Kir6.2-, SUR2A/Kir6.2- bzw. SUR2B/Kir6.2-Kanälen registriert (s. 3.4.3). Aufgeführt sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte ± SEM aus 5 unabhängigen Einzelerperimenten. E_{max} bezeichnet die maximale Substanz-induzierte Hemmung der Kanalaktivität. Bei den SUR1/Kir6.2-Kanälen wurde E_{max} auch in Gegenwart von 0,3 mM MgADP ermittelt [E_{max}(+ 0,3 mM MgADP)]. Die Selektivität der jeweiligen Testsubstanz wurde aus dem Verhältnis der Potenzen an SUR2A/Kir6.2- (IC_{50(2A/6.2)}/IC_{50(1/6.2)}) bzw. SUR2B/Kir6.2- (IC_{50(2B/6.2)}/IC_{50(1/6.2)}) gegenüber den SUR1/Kir6.2-Kanälen bestimmt.

DISKUSSION

Die in unseren Untersuchungen für humane SUR1/Kir6.2-Kanäle (in Abwesenheit von Kaliumkanalöffnern) ermittelte halbmaximal wirksame Nateglinid-Konzentration (74 nM, s. 4.4.1.2) stimmt gut mit dem unter ähnlichen Bedingungen ermittelten IC_{50} -Wert für murine rekombinante SUR1/Kir6.2-Kanäle überein (CHACHIN et al., 2003). Dies ist ein Indiz dafür, dass sich speziesübergreifend K_{ATP} -Kanäle der pankreatischen B-Zelle vom Menschen und von Nagetieren nicht nur hinsichtlich Leitfähigkeit, Kinetik, ATP-Sensitivität und Sulfonylharnstoffwirkung gleichen (ASHCROFT et al., 1987), sondern auch in der Empfindlichkeit gegenüber Sulfonylharnstoff-Analoga (DABROWSKI et al., 2001). Allerdings lagen die IC_{50} -Werte für die SUR2-Isoformen in der Studie von CHACHIN und Mitarbeitern (2003) um den Faktor 10 höher als bei uns. Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar. Unsere Untersuchungen zeigen ganz eindeutig eine Hemmung der Aktivität von SUR2/Kir6.2-Kanälen mit halbmaximal wirksamen Konzentrationen, die – wie für das Ein-Bindungsstellen-Modell zu erwarten – um den Faktor 4,5–6 links vom K_D der Bindungskurve liegen (s. 5.4.1, Abb.40).

5.4.3 Klinische Relevanz

Die Bestimmung der Gewebsselektivität von oralen Antidiabetika, die ihre Wirkung über die Hemmung von K_{ATP} -Kanälen der pankreatischen B-Zelle entfalten, ist kritisch für die Vorhersage unerwünschter, extrapankreatischer Effekte, da Sulfonylharnstoffrezeptoren in den unterschiedlichsten Körpergeweben, vor allem auch im Herzen und in der glatten Muskulatur (s. 1.1.1), vorkommen. Das Schließen von K_{ATP} -Kanälen könnte über eine Verlängerung der Aktionspotenzialdauer und eine Verzögerung der Repolarisation das Auftreten von Arrhythmien im Herzen begünstigen und über eine verstärkte Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur zur Entstehung einer arteriellen Hypertonie beitragen.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass Nateglinid eine ausgeprägte B-Zell-Selektivität besitzt (s. 5.4.2). Bei einer therapeutischen Plasmakonzentration von 10 μ M (GRIBBLE et al., 2001) und einer Plasmaeiweißbindung von 97–99% (NOVARTIS PHARMA, 2001) liegt die freie Konzentration im Plasma vermutlich unter 0,2 μ M. Da dieser Wert deutlich unter den ermittelten IC_{50} -Werten für die Hemmung der kardiovaskulären Kanäle liegt ($IC_{50}(\text{SUR2A/Kir6.2}) = 8,4 \mu\text{M}$ und $IC_{50}(\text{SUR2B/Kir6.2}) = 11 \mu\text{M}$; s. 5.4.2, Tab.1), wäre unter therapeutischen Bedingungen eine funktionell relevante Hemmung der Kanäle kaum zu erwarten. Bei analogem Wirkungsmechanismus ist die Situation für Nateglinid damit ähnlich günstig wie für Glibenclamid (therapeutische freie Plasmakonzentration kleiner als 10 nM; $IC_{50}(\text{SUR2/Kir6.2}) = 45–51 \text{ nM}$; s. 5.4.2, Tab.1).

DISKUSSION

Ein wesentlicher Vorteil von Nateglinid gegenüber den Sulfonylharnstoffen der 2. Generation wie Glibenclamid und Glipizid basiert jedoch auf seinem günstigen pharmakokinetischen Profil. Nateglinid zeichnet sich besonders durch einen raschen Wirkungseintritt und eine kurze Wirkdauer aus (HU et al., 2000). Die Gefahr einer Überdosierung ist damit geringer. Kurz vor den Mahlzeiten appliziert, verbessert Nateglinid vor allem die insuffiziente initiale Insulinantwort und reduziert auf diese Weise die postprandialen Hyperglykämien, während es den verzögerten flachen Insulinanstieg kaum verändert (KEILSON et al., 2000; HU et al., 2003). Dadurch ermöglicht Nateglinid den Patienten einen flexibleren Tagesablauf mit einer individuell angepassten Mahlzeitenverteilung bei einer gleichzeitig erniedrigten Inzidenz von protrahierten Hypoglykämien, welche die schwerwiegendste Komplikation bei der Therapie mit Glibenclamid darstellen. Die bei den Sulfonylharnstoffen ebenfalls häufig beobachtete Erhöhung des Appetits aufgrund der langandauernden Hyperinsulinämien wird reduziert, was die Gewichtskontrolle auf Seiten des Patienten erleichtern könnte. Zusätzlich zögert die Reduktion der exzessiven Insulinsekretion möglicherweise die frühe Erschöpfung der B-Zellen und damit die schnelle Progredienz der Erkrankung hinaus.

6 ZUSAMMENFASSUNG

ATP-sensitive K^+ -Kanäle sind mit tetradimerer Struktur (SURx/Kir6.y)₄ aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, einer regulatorischen Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit (SURx) und einer porenbildenden, einwärtsgerichtenden K^+ -Kanal-Untereinheit (Kir6.y). Sie unterliegen einer komplexen Regulation durch zytosolische Nukleotide. Ihre Offenwahrscheinlichkeit wird durch freies ATP und ADP verringert, durch die Mg^{2+} -Komplexe von Nukleosiddiphosphaten wie MgADP oder MgGDP dagegen erhöht. Auch Pharmaka modulieren die Kanalaktivität. Über Wechselwirkung mit der regulatorischen SUR-Untereinheit werden die Kanäle durch Sulfonylharnstoffe bzw. deren Analoga geschlossen und durch die strukturell sehr heterogen zusammengesetzte Substanzklasse der Kaliumkanalöffner aktiviert.

In den B-Zellen des Pankreas übernehmen K_{ATP} -Kanäle vom Typ SUR1/Kir6.2 eine zentrale Aufgabe in der Glucose-stimulierten Insulinsekretion, indem sie den Metabolismus der B-Zelle mit der elektrischen Aktivität der Plasmamembran verknüpfen. An rekombinanten SUR1/Kir6.2-Kanälen sollte der Mechanismus der Interaktion zwischen Nukleosiddi- und -triphosphaten analysiert werden. Erstaunlicherweise kam es im Beisein steigender Konzentrationen von MgGDP zu einer signifikanten Abnahme der inhibitorischen Potenz von ATP, wobei sich diese allerdings nicht beliebig weit senken ließ, sondern gegen einen Grenzwert lief. Die beobachtete Reduktion der ATP-Empfindlichkeit durch MgGDP war dabei nicht auf eine kompetitive Interaktion um die inhibitorische Bindungsstelle auf der Kir6.2-Untereinheit zurückzuführen. Ähnlich wie für die ATP-Konzentrationshemmkurve rief maximale Kanalaktivierung durch MgGDP auch eine Rechtsverschiebung der Kurven anderer inhibitorischer Nukleotide hervor, ohne jedoch die charakteristische Rangfolge der Potenzen zu ändern. Offensichtlich versetzen aktivierende Nukleosiddiphosphate den K_{ATP} -Kanal in einen Zustand mit niedriger Affinität für inhibitorische Nukleotide.

Zur Klärung der Stöchiometrie der ATP-Wirkung im niederaffinen Zustand wurden durch Koexpression ATP-empfindlicher Kir6.2_{wt}-Untereinheiten mit ATP-unempfindlichen mutanten Kir6.2_{G334D}-Untereinheiten in cDNA-Verhältnissen von 1:1 und 1:10 heteromultimere Kanäle mit zufällig verteilten Untereinheiten konstruiert. Die ATP-Konzentrationshemmkurven der Mischkanäle im niederaffinen Zustand wurden mit theoretischen Kurven verglichen, die unter der Annahme konstruiert wurden, dass eine Hemmung der Kanalaktivität die Besetzung von einer, zwei, drei oder vier Bindungsstellen pro Kanalkomplex erfordert. Die Ergebnisse wiesen eine gute Übereinstimmung mit dem Ein-Bindungsstellen-Modell auf,

ZUSAMMENFASSUNG

wohingegen die übrigen Modelle merklich von den gemessenen Kurven abweichen. Wir folgern, dass auch im niederaffinen Zustand die Besetzung einer einzigen inhibitorischen Bindungsstelle pro Kanal genügt, um die Kanalaktivität vollständig zu unterdrücken.

Der niederaffine Zustand konnte indessen nicht nur durch aktivierende Nukleosiddiphosphate erzeugt werden, sondern ebenfalls durch Mutationen wie C166S im Bereich des Kir6.2, die eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des Kanals induzieren. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Affinität der inhibitorischen Nukleotidbindungsstelle auf der Kir6.2-Untereinheit durch „Gating“ kontrolliert wird. Die Koexpression ATP-unempfindlicher Kir6.2_{G334D}-Untereinheiten mit der zusätzlichen Mutation C166S und ATP-empfindlicher Kir6.2_{wt}-Untereinheiten im Verhältnis 1:1 erzeugte Kanäle mit einer um mehr als den Faktor 10 geringeren ATP-Empfindlichkeit als unter den genannten Bedingungen ohne die Mutation C166S. Der Befund zeigt, dass C166S die ATP-Empfindlichkeit der koexprimierten Wildtyp-Untereinheit durch seinen Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle beeinflusst und belegt damit eine kooperative Interaktion der Untereinheiten bei dieser Form des „Gating“. Interessanterweise ließen sich aber auch die bei Koexpression von C166S-G334D und dem Wildtyp im Verhältnis 1:1 resultierenden Mischkanäle zu mehr als 90% schließen. Dies bedeutet, dass das Besetzen einer hochaffinen Wildtyp-Untereinheit durch inhibitorisches ATP ausreicht, um die Kanalaktivität zu unterdrücken und zeigt darüber hinaus, dass die Kanäle auch dann geschlossen werden können, wenn sie neben der Wildtyp-Untereinheit aus bis zu drei Untereinheiten mit zusätzlichem C166S bestehen, also aus Untereinheiten, die wahrscheinlich nicht spontan in den langen Geschlossenzustand wechseln. Die Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit bei diesen Mischkanälen unterscheidet sich von der Hemmung bei reinen Wildtyp-Kanälen allerdings dadurch, dass wesentlich höhere ATP-Konzentrationen erforderlich sind. Die mutanten Untereinheiten verhindern also anscheinend, dass die Wildtyp-Untereinheiten den „typischen“ – auf Kooperativität der vier Kir6.2-Untereinheiten beruhenden – Geschlossenzustand einnehmen können, der mit einer hohen Affinität für ATP verbunden ist. Die niedrige ATP-Sensitivität der Mischkanäle ist damit klares Indiz dafür, dass sich der ATP-induzierte Geschlossenzustand qualitativ von dem der reinen Wildtyp-Kanäle unterscheidet.

ATP reguliert den Kanal daher offenbar über zwei verschiedene „Gating“-Mechanismen: Während bei niedriger Offenwahrscheinlichkeit und hoher ATP-Empfindlichkeit alle vier Kir6.2-Untereinheiten gemeinsam als kooperative Einheit funktionieren und wahrscheinlich in einer Art „Blendenmechanismus“ durch Seitwärts- oder Drehbewegungen der transmembranären Helices am „Gating“ beteiligt sind, überführt maximale Aktivierung die Kanäle

ZUSAMMENFASSUNG

in einen Zustand mit niedriger Affinität für ATP, bei dem die porenblockierende, durch ATP stabilisierte Konformation vermutlich auf die Untereinheit des Kanalkomplexes beschränkt bleibt, die durch ATP besetzt ist.

E23K, ein häufiger Polymorphismus in der porenformenden Untereinheit Kir6.2 der K_{ATP} -Kanäle in der B-Zelle des Pankreas, besitzt funktionelle Relevanz und spielt vermutlich eine bedeutsame Rolle in der Pathophysiologie des Typ-2-Diabetes, indem er eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle induziert. In Patch-Clamp-Untersuchungen sollte der Einfluss von E23K auf die Regulation der Aktivität von pankreatischen K_{ATP} -Kanälen durch Nukleosiddiphosphate genauer bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass der Polymorphismus bei gleichzeitiger Anwesenheit von aktivierendem MgGDP und inhibitorischem ATP gegensätzliche Wirkungen auf die Potenzen der Modulatoren ausübt: Während das Öffnen des K_{ATP} -Kanals durch MgGDP erleichtert wird, reduziert E23K die Empfindlichkeit gegenüber dem inhibitorisch wirksamen ATP. Dies gilt, wenn beide Nukleotide in Konzentrationen vorliegen, die unter physiologischen Bedingungen für Nukleosiddi- bzw. -triphosphate im Zytosol der B-Zelle beobachtet werden. Die Ergebnisse unterstützen daher die These, dass der Polymorphismus E23K prädisponierend für die Entstehung des Typ-2-Diabetes wirkt, und zwar durch eine veränderte K_{ATP} -Kanalreaktion auf die in Abhängigkeit vom metabolischen Status der B-Zelle fluktuierenden intrazellulären Nukleotidkonzentrationen, was vermutlich eine Überaktivität der K_{ATP} -Kanäle und letztlich eine diskrete Hemmung der Insulinfreisetzung zur Folge hat.

Die Expression von Kir6.2 ist im menschlichen bzw. tierischen Körper nicht nur auf die B-Zellen des Pankreas beschränkt, so dass der Polymorphismus E23K noch weitere physiologische Effekte (z. B. auf die Registrierung des Glucosespiegels im Gehirn) auslösen könnte. Um den Einfluss von E23K näher analysieren zu können, sollte ein geeignetes Tiermodell in Form eines transgenen Mausstammes mit dem Polymorphismus etabliert werden. Für das gezielte Einbringen von E23K durch homologe Rekombination wurde zunächst aus genomischer Maus-DNA ein „Replacement-Vektor“ konstruiert. Über Southern Blot in Kombination mit Hybridisierung sowie PCR-Analysen gelang aus dem Cosmid-Klon MPMGc121E02180Q2 der genomischen Bibliothek #121 (vom RZPD) die Isolierung eines rund 10-kb-großen DNA-Fragmentes mit dem zu modifizierenden Kir6.2-Gen. Nach Sequenzierung des Gens und seiner näheren Umgebung wurde das Fragment verkleinert, der Polymorphismus E23K generiert und hinter dem Stopcodon ein positiver Selektionsmarker

ZUSAMMENFASSUNG

integriert. Diese *Neo*-Kassette soll zur Identifizierung korrekt transfizierter embryonaler Stammzellen beitragen und im Anschluss an die Screening-Verfahren wieder aus dem Zielchromosom entfernt werden, um Interferenzen der fremden DNA mit endogenen Promotoren und Genen zu vermeiden. Eine *loxP*-Flankierung der *Neo*-Kassette ermöglichte unter Einwirkung von *Cre*-Rekombinase bereits die erfolgreiche Elimination eines überwiegenden Teils des eingefügten Selektionsmarkers aus dem konstruierten „Replacement-Vektor“. Der nächste Schritt auf dem Weg zur Generierung des transgenen Mausmodells entspricht der Testung des Targeting-Vektors in embryonalen Stammzellen. Dieser Schritt soll in Kooperation mit anderen Gruppen erfolgen.

K_{ATP}-Kanäle kommen nicht nur in den B-Zellen des Pankreas, sondern auch in Neuronen, in Herz- und Skelettmuskelzellen sowie in glatten Gefäßmuskelzellen vor. Verschiedene SUR-Untereinheiten verleihen den Kanälen ihre jeweiligen gewebsspezifischen pharmakologischen Eigenschaften. Bislang wurden drei Subtypen des Sulfonylharnstoffrezeptors kloniert: SUR1, die regulatorische Untereinheit des K_{ATP}-Kanals der B-Zelle des Pankreas und zahlreicher Neurone und die kardiovaskulären SUR2-Isoformen SUR2A bzw. SUR2B. Während SUR1 eine hohe Affinität für die Bindung der Sulfonylharnstoffe entfaltet, weisen die SUR2-Isoformen eine hohe Affinität für Kaliumkanalöffner auf. Eine hohe B-Zell-Selektivität neuer Sulfonylharnstoff-Analoga könnte das Risiko des Auftretens unerwünschter Arzneimittelwirkungen in der medikamentösen Therapie des Typ-2-Diabetes mit oralen Antidiabetika minimieren. In diesem Zusammenhang sollte die Gewebselektivität von Nateglinid an rekombinanten humanen pankreatischen und extrapancreatischen K_{ATP}-Kanälen ermittelt werden. Es zeigte sich, dass Nateglinid mit derselben hochaffinen Bindungsstelle der SUR-Untereinheit interagiert, die auch durch die Sulfonylharnstoffe besetzt wird. Aufgrund ihrer tetradimeren Struktur verfügen K_{ATP}-Kanäle über vier Rezeptorbindungsstellen für Sulfonylharnstoffe. Ein Vergleich der Affinität und Potenz von Nateglinid ergab, dass die IC₅₀-Werte zur Hemmung der Kanalaktivität 4,5–6,1fach niedriger lagen als die aus den Bindungsexperimenten stammenden K_D-Werte. Außerdem waren die Konzentrationshemmkurven signifikant steiler als die Bindungskurven. Beides steht im Einklang mit der früheren Beobachtung, dass die Besetzung einer einzigen der vier Sulfonylharnstoffbindungsstellen pro Kanalkomplex ausreicht, um den Kanal zu schließen. Die maximal induzierbare Hemmung der Kanalaktivität unterschied sich dabei nicht von der durch Glibenclamid, Glipizid oder Tolbutamid. Nateglinid wirkt daher ebenso wie die Sulfonylharnstoffe als voller Agonist an humanen pankreatischen und kardiovaskulären K_{ATP}-Kanälen. Die Selektivität von Nateglinid

ZUSAMMENFASSUNG

für SUR1/Kir6.2-Kanäle war mit einem Faktor von 100–150 sehr viel ausgeprägter als die von Tolbutamid und ähnlich der von Glipizid und Glibenclamid. Der wesentliche Vorteil von Nateglinid gegenüber Glibenclamid und Glipizid beruht folglich nicht auf einer größeren Selektivität für die K_{ATP} -Kanäle der B-Zelle, sondern auf seinem günstigen pharmakokinetischen Profil mit raschem Anfluten und kurzer Wirkdauer, was die Gefahr einer Überdosierung deutlich vermindern sollte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AGUILAR-BRYAN L, CLEMENT JP IV, GONZALEZ G, KUNJILWAR K, BABENKO A, BRYAN J** (1998): Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} -channels. *Physiol Rev* 78 (1): 227–245.
- AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J** (1999): Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 20 (2): 101–135.
- ASHCROFT FM, KAKEI M, KELLY RP, SUTTON R** (1987): ATP-sensitive K^+ channels in human isolated pancreatic B-cells. *FEBS Lett* 215 (1): 9–12.
- ASHCROFT FM, RORSMAN P** (1989): Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54 (2): 87–143.
- ASHCROFT FM, GRIBBLE FM** (1998): Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Neurosci* 21 (7): 288–294.
- ASHCROFT FM, GRIBBLE FM** (1999): ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42 (8): 903–919.
- ASHFIELD R, ASHCROFT SJH** (1998): Cloning of the promoters for the β -cell ATP-sensitive K-channel subunits Kir6.2 and SUR1. *Diabetes* 47 (8): 1274–1280.
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K** [Hrsg.] (2000): Analysis of DNA Sequenzen by Blotting and Hybridization. In: *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley & Sons, Inc, New York: Chapter 2, Section IV.
- BABENKO AP, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J** (1998): A view of SUR/K_{IR}6.x, K_{ATP} -channels. *Annu Rev Physiol* 60: 667–687.
- BARROSO I, LUAN J, MIDDELBERG RP, HARDING AH, FRANKS PW, JAKES RW, CLAYTON D, SCHAFER AJ, O'RAHILLY S, WAREHAM NJ** (2003): Candidate Gene Association Study in Type 2 Diabetes Indicates a Role for Genes Involved in beta-Cell function as Well as Insulin action. *PloS Biol* 1 (1):E20. Epub 2003.
- BAUKROWITZ T, SCHULTE U, OLIVER D, HERLITZE S, KRAUTER T, TUCKER SJ, RUPERSBERG JP, FAKLER B** (1998): PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science* 282 (5391): 1141–1144.
- BELL GI, POLONSKY KS** (2001): Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414 (6865): 788–791.
- BENNETT JP** (1978): Methods in binding studies. In: *Neurotransmitter receptor binding*; hrsg. von Yamamura HI, Enna SJ und Kuhar MJ; Raven Press, New York: 57–90.
- BISHOP J** (1999): Transgenic Mammals. Cell and molecular biology in action series. Pearson Education Limited, Edinburgh Gate, Harlow, UK.

LITERATURVERZEICHNIS

- BRANSTROM R, CORKEY BE, BERGGREN PO, LARSSON O** (1997): Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 272 (28): 17390–17394.
- BRAY KM, QUAST U** (1992): A specific binding site for K⁺-channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* 267 (17): 11689–11692.
- CHACHIN M, YAMADA M, FUJITA A, MATSUOKA T, MATSUSHITA K, KURACHI Y** (2003): Nateglinide, a D-phenylalanine derivative lacking either a sulfonylurea or benzamido moiety, specifically inhibits pancreatic β -cell-type K_{ATP} channels. *J Pharmacol Exp Ther* 304 (3): 1025–1032.
- CHENG YC, PRUSOFF WH** (1973): Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22 (23): 3099–3108.
- CHUTKOW WA, SIMON MC, LE BEAU MM, BURANT CF** (1996): Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes* 45 (10): 1439–1445.
- CONTI LR, RADEKE CM, SHYNG SL, VANDENBERG CA** (2001): Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 276 (44): 41270–41278.
- DABROWSKI M, WAHL P, HOLMES WE, ASHCROFT FM** (2001): Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* 44 (6): 747–756.
- DAVIS NW, STANDEN NB, STANFIELD PR** (1991): ATP-dependent potassium channels of muscle cells: their properties, regulation, and possible functions. *J Bioenerg Biomembr* 23 (4): 509–535.
- DENG C, CAPECCHI MR** (1992): Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 12 (8): 3365–3371.
- DETIMARY P, VAN DEN BERGHE G, HENQUIN JC** (1996): Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem* 271 (34): 20559–20565.
- DETIMARY P, DEJONGHE S, LING Z, PIPELEERS D, SCHUIT F, HENQUIN JC** (1998): The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in β cells but not in α cells and are observed in human islets. *J Biol Chem* 273 (51): 33905–33908.
- DRAIN P, LI L, WANG J** (1998): K_{ATP} channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the pore-forming subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (23): 13953–13958.

- DOLIBA NM, QIN W, VATAMANIUK MZ, LI C, ZELENT D, NAJAFI H, BUETTGER CW, COLLINS HW, CARR RD, MAGNUSON MA, MATSCHINSKY FM** (2004): Restitution of defective glucose-stimulated insulin release of sulfonylurea type 1 receptor knockout mice by acetylcholine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (5): E834–843. Epub 2004 Jan 21.
- DÖRSCHNER H, BREKARDIN E, UHDE I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M** (1999): Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol* 55 (6): 1060–1066.
- DÖRSCHNER H** (2000): Bedeutung des C-Terminus von Sulfonylharnstoffrezeptoren für die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Kalium-Kanal-Öffnern. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- DOUPNIK CA, DAVIDSON N, LESTER HA** (1995): The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5 (3): 268–277.
- DUNNE MJ, PETERSEN OH** (1986a): Intracellular ADP activates K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* 208 (1): 59–62.
- DUNNE MJ, PETERSEN OH** (1986b): GTP and GDP activation of K^+ channels that can be inhibited by ATP. *Pflügers Arch* 407 (5): 564–565.
- DUNNE MJ, WEST-JORDAN JA, ABRAHAM RJ, EDWARDS RH, PETERSEN OH** (1988): The gating of nucleotide-sensitive K^+ channels in insulin-secreting cells can be modulated by changes in the ratio ATP^4-/ADP^{3-} and by nonhydrolyzable derivatives of both ATP and ADP. *J Membr Biol* 104 (2): 165–177.
- DUNNE MJ, PETERSEN OH** (1991): Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secreting coupling. *Biochim Biophys Acta* 1071 (1): 67–82.
- ENKVETCHAKUL D, LOUSSOUARN G, MAKHINA E, SHYNG SL, NICHOLS CG** (2000): The kinetic and physical basis of K_{ATP} channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys J* 78 (5): 2334–2348.
- ENKVETCHAKUL D, LOUSSOUARN G, MAKHINA E, NICHOLS CG** (2001): ATP interaction with the open state of the $K(ATP)$ channel. *Biophys J* 80 (2): 719–728.
- FABIATO A** (1988): Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. In: *Methods in Enzymology* 157: 378–417, Part Q; hrsg. von Fleischer S, Fleischer B; Academic Press, San Diego.
- FAN Z, MAKIELSKI JC** (1997): Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* 272 (9): 5388–5395.
- FINDLAY I** (1987): The effects of magnesium upon adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a rat insulin-secreting cell line. *J Physiol* 391: 611–629.

- GLOYN AL, WEEDON MN, OWEN KR, TURNER MJ, KNIGHT BA, HITMAN G, WALKER M, LEVY JC, SAMPSON M, HALFORD S, MCCARTHY MI, HATTERSLEY AT, FRAYLING TM** (2003): Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic β -cell K_{ATP} channel subunits Kir6.2(*KCNJ11*) and SUR1 (*ABCC8*) confirm that the *KCNJ11* E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52 (2): 568–572.
- GLUZMANN Y** (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23 (1): 175–182.
- GORUS FK, SCHUIT FC, IN'T VELD PA, GEPTS W, PIPELEERS DG** (1988): Interaction of sulfonylureas with pancreatic β -cells. A study with glyburide. *Diabetes* 37 (8): 1090–1095.
- GRIBBLE FM, TUCKER SJ, ASHCROFT FM** (1997a): The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* 16 (6): 1145–1152.
- GRIBBLE FM, TUCKER SJ, ASHCROFT FM** (1997b): The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K^+ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol* 504 (Pt 1): 35–45.
- GRIBBLE FM, ASHFIELD R, ÄMMÄLÄ C, ASHCROFT FM** (1997c): Properties of cloned ATP-sensitive K^+ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 498 (Pt 1): 87–98.
- GRIBBLE FM, PROKS P, CORKEY BE, ASHCROFT FM** (1998a): Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem* 273 (41): 26383–26387.
- GRIBBLE FM, TUCKER SJ, SEINO S, ASHCROFT FM** (1998b): Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac beta-cell K(ATP) channels. *Diabetes* 47 (9): 1412–1418.
- GRIBBLE FM, LOUSSOUARN G, TUCKER SJ, ZHAO C, NICHOLS CG, ASHCROFT FM** (2000): A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J Biol Chem* 275 (39): 30046–30049.
- GRIBBLE FM, MANLEY SE, LEVY JC** (2001): Randomized dose ranging study of the reduction of fasting and postprandial glucose in type 2 diabetes by nateglinide (A-4166). *Diabetes Care* 24 (7): 1221–1225.
- GROSS I, TOMAN A, UHDE I, SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M** (1999): Stoichiometry of potassium channel opener action. *Mol Pharmacol* 56 (6): 1370–1373.
- GROSS I** (2000): Aktivierung rekombinanter K_{ATP} -Kanäle durch Kalium-Kanal-Öffner und Nukleosiddiphosphate. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.

LITERATURVERZEICHNIS

- HAMBROCK A, LÖFFLER-WALZ C, KURACHI Y, QUAST U** (1998). Mg^{2+} and ATP dependence of K_{ATP} channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* 125 (3): 577–583.
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ** (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391 (2): 85–100.
- HÄRING HU, JOOST HG, LAUBE H, MATTHAEI S, MEISSNER HP, PANTEN U, SCHERNTHANER G** (2002): Behandlung des Typ 2 Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 2): 9–13.
- HEURTEAUX C, BERTAINA V, WIDMANN C, LAZDUNSKI M** (1993): K^+ channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid β -protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (20): 9431–9435.
- HIGGINS CF** (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67–113.
- HU S, WANG S, DUNNING BE** (1999): Tissue selectivity of antidiabetic agent nateglinide: study on cardiovascular and beta-cell K_{ATP} channels. *J Pharmacol Exp Ther* 291 (3): 1372–1379.
- HU S, WANG S, FANELLI B, BELL PA, DUNNING BE, GEISSE S, SCHMITZ R, BOETTCHER BR** (2000): Pancreatic β -cell K_{ATP} channel activity and membrane-binding studies with nateglinide: A comparison with sulfonylureas and repaglinide. *J Pharmacol Exp Ther* 293 (2): 444–452.
- HU S, BOETTCHER BR, DUNNING BE** (2003). The mechanisms underlying the unique pharmacodynamics of nateglinide. *Diabetologia* 46 (Suppl 1): M37–M43.
- HUOPIO H, SHYNG SL, OTONKOSKI T, NICHOLS CG** (2002): K_{ATP} channels and insulin secretion disorders. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 (2): E207–E216.
- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP IV, NAMBA N, INAZAWA J, GONZALEZ G, AGUILAR-BRYAN L, SEINO S, BRYAN J** (1995a): Reconstitution of IK_{ATP} : an inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. *Science* 270 (5239): 1166–1170.
- INAGAKI N, INAZAWA J, SEINO S** (1995b): cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human ATP-sensitive potassium channel, uKATP-1, gene (KCNJ8). *Genomics* 30 (1): 102–104.
- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP IV, WANG CZ, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J, SEINO S** (1996): A family of sulphonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron* 16 (5): 1011–1017.
- ISOMOTO S, KONDO C, YAMADA M, MATSUMOTO S, HIGASHIGUCHI O, HORIO Y, MATSUZAWA Y, KURACHI Y** (1996): A novel sulphonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ -channel. *J Biol Chem* 271: 24321–24324.

LITERATURVERZEICHNIS

- KEILSON L, MATHER S, WALTER YH, SUBRAMANIAN S, MCLEOD JF** (2000): Synergistic effects of nateglinide and meal administration on insulin secretion in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (3): 1081–1086.
- KENNEDY HJ, POULI AE, AINSOW EK, JOUAVILLE LS, RIZZUTO R, RUTTER GA** (1999): Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet β -cells. Potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem* 274 (19): 13281–13291.
- KOSTER JC, MARSHALL BA, ENSOR N, CORBETT JA, NICHOLS CG** (2000): Targeted overactivity of β cell K_{ATP} channels induces profound neonatal diabetes. *Cell* 100 (6): 645–654.
- KOWLURU A, METZ SA** (1994): Characterization of nucleoside diphosphokinase activity in human and rodent pancreatic beta cells: evidence for its role in the formation of guanosine triphosphate, a permissive factor for nutrient-induced insulin secretion. *Biochemistry* 33 (41): 12495–12503.
- LANG J** (1999): Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259 (1–2): 3–17.
- LI L, WANG J, DRAIN P** (2000): The I182 region of $K_{i6.2}$ is closely associated with ligand binding in K_{ATP} channel inhibition by ATP. *Biophys J* 79 (2): 841–852.
- LOVE-GREGORY L, WASSON J, LIN J, SKOLNICK G, SUAREZ B, PERMUTT MA** (2003): An E23K single nucleotide polymorphism in the islet ATP-sensitive potassium channel gene ($Kir6.2$) contributes as much to the risk of Type II diabetes in Caucasians as the PPAR γ Pro12Ala variant. *Diabetologia* 46 (1): 136–137.
- MACKINNON R** (1995): Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* 14 (5): 889–892.
- MALAISSÉ WJ, MALAISSÉ-LAGAE F, MAYHEW DA, WRIGHT PH** (1967): Effects of sulfonylureas upon insulin secretion by the rat's pancreas. In: *Tolbutamide after ten years*; hrsg. von Butterfield WJH, von Westering W; Excerpta Medica, Amsterdam: 49–60.
- MALAISSÉ WJ, SENER A** (1987): Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 927 (2): 190–195.
- MARKWORTH E, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M** (2000): ATP⁴⁻ mediates closure of pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes* 49 (9): 1413–1418.
- MARKWORTH E** (2001): Stöchiometrie der Wirkung von Sulfonylharnstoffen und Nukleotiden an rekombinanten K_{ATP} -Kanälen. *Dissertation*, Technischen Universität Braunschweig.

LITERATURVERZEICHNIS

- MATSCHINSKY FM** (1996): Banting Lecture 1995: A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45 (2): 223–241.
- MEYER U** (2002): Untersuchungen zur pathophysiologischen Relevanz von Polymorphismen im Kir6.2-Gen und der Gewebsselektivität von K_{ATP}-Kanal-Modulatoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig
- MIKI T, TASHIRO F, IWANAGA T, NAGASHIMA K, YOSHITOMI H, AIHARA H, NITTA Y, GONOI T, INAGAKI N, MIYAZAKI J, SEINO S** (1997): Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant-negative K_{ATP} channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (22): 11969–11973.
- MIKI T, NAGASHIMA K, TASHIRO F, KOTAKE K, YOSHITOMI H, TAMAMOTO A, GONOI T, IWANAGA T, MIYAZAKI J, SEINO S** (1998): Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K_{ATP} channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (18): 10402–10406.
- MIKI T, NAGASHIMA K, SEINO S** (1999): The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic β -cells. *J Mol Endocrinol* 22 (2): 113–123
- MIKI T, LISS B, MINAMI K, SHIUCHI T, SARAYA A, KASHIMA Y, HORIUCHI M, ASHCROFT F, MINOKOSHI Y, ROEPER J, SEINO S** (2001): ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4 (5): 507–512.
- MIKI T, SUZUKI M, SHIBASAKI T, UEMURA H, SATO T, YAMAGUCHI K, KOSEKI H, IWANAGA T, NAKAYA H, SEINO S** (2002): Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med* 8 (5): 466–472.
- NEWGARD CB, MCGARRY JD** (1995): Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64: 689–719.
- NICHOLS CG, LEDERER WJ** (1991): Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol* 261 (6 Pt 2): H1675–H1686.
- NICHOLS CG, LOPATIN AN** (1997): Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 59: 171–191.
- NIELSEN EM, HANSEN L, CARSTENSEN B, ECHWALD SM, DRIVSHOLM T, GLÜMER C, THORSTEINSSON B, BORCH-JOHNSEN K, HANSEN T, PEDERSEN O** (2003): The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 52 (2): 573–577.
- NOVARTIS-PHARMA** (2003): Starlix® 60/120mg Filmtabletten. Fachinformation. BPI Service GmbH, FachInfo Service; 1–3.

LITERATURVERZEICHNIS

- PANTEN U, SCHWANSTECHE M, SCHWANSTECHE C** (1992): Pancreatic and extra-pancreatic sulfonylurea receptors. *Horm Metab Res* 24 (12): 549–554.
- POLONSKY KS, STURIS J, BELL GI** (1996): Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus – a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334 (12): 777–783.
- REPKE H, LIEBMANN C** (1987): Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- RORSMAN P, TRUBE G** (1985): Glucose dependent K^+ -channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflügers Arch* 405 (4): 305–309.
- RORSMAN P** (1997): The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40 (5): 487–495.
- RUDOLPH U, MÖHLER H** (1999): Genetically modified animals in pharmacological research: future trends. *Eur J Pharmacol* 375 (1–3): 327–337.
- RUSS U, HAMBROCK A, ARTUNC F, LÖFFLER-WALZ, HORIO Y, KURACHI Y, QUAST U** (1999): Coexpression with the inward rectifier K^+ channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. *Mol Pharmacol* 56 (5): 955–961.
- SAKURA H, WAT N, HORTON V, MILLNS H, TURNER RC, ASHCROFT FM** (1996): Sequence variations in the human Kir6.2 gene, a subunit of the beta-cell ATP-sensitive K-channel: no association with NIDDM in white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro. *Diabetologia* 39 (10): 1233–1236.
- SCHENKEL J** (1995): Transgene Tiere. Reihe: Labor im Fokus. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag.
- SCHMID-ANTOMARCHI H, DE WEILLE J, FOSSET M, LAZDUNSKI M** (1987): The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K^+ -channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 262 (33): 15840–15844.
- SCHWANSTECHE C, DICKEL C, EBERS I, LINS S, ZÜNKLER BJ, PANTEN U** (1992a): Diazoxide-sensitivity of the adenosine 5'-triphosphate-dependent K^+ channel in mouse pancreatic beta-cells. *Br J Pharmacol* 107 (1): 87–94.
- SCHWANSTECHE C, DICKEL C, PANTEN U** (1992b): Cytosolic nucleotides enhance the tolbutamide sensitivity of the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic B cells by their combined actions at inhibitory and stimulatory receptors. *Mol Pharmacol* 41 (3): 480–486.
- SCHWANSTECHE C, DICKEL C, PANTEN U** (1994): Interaction of tolbutamide and cytosolic nucleotides in controlling the ATP-sensitive K^+ channel in mouse beta-cells. *Br J Pharmacol* 111 (1): 302–310.

LITERATURVERZEICHNIS

- SCHWANSTECHER C, MEYER M, SCHWANSTECHER M, PANTEN U** (1998): Interaction of N-benzoyl-D-phenylalanine and related compounds with the sulphonylurea receptor of β -cells. *Br J Pharmacol* 123 (6): 1023–1030.
- SCHWANSTECHER C, MEYER U, SCHWANSTECHER M** (2002): $K_{IR6.2}$ polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic β -cell ATP-sensitive potassium channels. *Diabetes* 51 (3): 875–879.
- SCHWANSTECHER M, LÖSER S, RIETZE I, PANTEN U** (1990): Mg^{2+} ATP controls glibenclamide- and diazoxide-binding to their receptor in pancreatic B-cells. *Diabetologia* 33: A78.
- SCHWANSTECHER M, BEHREND S, PANTEN U** (1991a): The Mg^{2+} -complex of ATP regulates the affinity of the solubilized sulfonylurea receptor from HIT-cells. *Diabetologia* 34 (Suppl. 2): A63.
- SCHWANSTECHER M, LÖSER S, RIETZE I, PANTEN U** (1991b): Phosphate and thiophosphate group donating adenine and guanine nucleotides inhibit glibenclamide binding to membranes from pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343 (1): 83–89.
- SCHWANSTECHER M, BEHREND S, BRANDT C, PANTEN U** (1992c): The binding properties of the solubilized sulfonylurea receptor from a pancreatic B-cell line are modulated by the Mg^{++} -complex of ATP. *J Pharmacol Exp Ther* 262 (2): 495–502.
- SCHWANSTECHER M, BRANDT C, BEHREND S, SCHAUPP U, PANTEN U** (1992d): Effects of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic β -cell line and rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 106 (2): 295–301.
- SCHWANSTECHER M, SCHAUPP U, LÖSER S, PANTEN U** (1992e): The binding properties of the particulate and solubilized sulfonylurea receptor from cerebral cortex are modulated by the Mg^{2+} -complex of ATP. *J Neurochem* 59 (4): 1325–1335.
- SCHWANSTECHER M, SIEVERDING C, DÖRSCHNER H, GROSS I, AGUILAR-BRYAN L, SCHWANSTECHER C, BRYAN J** (1998): Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* 17 (19): 5529–5535.
- SCHWANSTECHER C, SCHWANSTECHER M** (2002): Nucleotide sensitivity of pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes* 51 (Suppl 3): S358–S362.
- SEGHERS V, NAKAZAKI M, DEMAYO F, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J** (2000): Sur1 knockout mice. A model for K_{ATP} channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275 (13): 9270–9277.
- SEINO S** (2003): Physiology and pathophysiology of K_{ATP} channels in the pancreas and cardiovascular system: a review. *J Diabetes Complications* 17 (Suppl 2): 2–5.
- SEINO S, MIKI T** (2003): Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 81 (2): 133–176.
- SHYNG SL, NICHOLS CG** (1998): Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* 282 (5391): 1138–1141.

LITERATURVERZEICHNIS

- SIEVERDING C** (1998): Identifikation und Charakterisierung der Bindungsstelle für Kalium-Kanal-Öffner auf Sulfonylharnstoffrezeptoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- SUNAGA Y, GONOI T, SHIBASAKI T, ICHIKAWA K, KUSAMA H, YANO H, SEINO S** (2001): The effects of mitiglinide (KAD-1229), a new anti-diabetic drug, on ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: comparison with the sulfonylureas and nateglinide. *Eur J Pharmacol* 431 (1): 119–125.
- TE RIELE H, MAANDAG ER, BERNIS A** (1992): Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (11): 5128–5132.
- TOMAN A** (2001): Lokalisation der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe auf Sulfonylharnstoffrezeptoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- TORRES RM, KÜHN R** (1997): Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press Inc.
- TRAPP S, TUCKER SJ, ASHCROFT FM** (1997): Activation and inhibition of K-ATP currents by guanine nucleotides is mediated by different channel subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (16): 8872–8877.
- TRAPP S, PROKS P, TUCKER SJ, ASHCROFT FM** (1998): Molecular analysis of ATP-sensitive K channel gating and implications for channel inhibition by ATP. *J Gen Physiol* 112 (3): 333–349.
- TRUBE G, RORSMAN P, OHNO-SHOSAKU T** (1986): Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ -channel in mouse pancreatic B-cell. *Pflügers Arch* 407 (5): 493–499.
- TUCKER SJ, GRIBBLE FM, ZHAO C, TRAPP S, ASHCROFT FM** (1997): Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K^+ -channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387 (6629): 179–183.
- TUSNÁDY GE, BAKOS E, VARADI A, SARKADI B** (1997): Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS lett* 402 (1): 1–3.
- UHDE I, TOMAN A, GROSS I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M** (1999): Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* 274 (40): 28079–28082.
- UHDE I** (2001): Lokalisation der Bindungsstelle für Kalium-Kanal-Öffner auf Sulfonylharnstoffrezeptoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP** (1998): Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352 (9131): 837–853.

LITERATURVERZEICHNIS

- VAN DEURSEN J, WIERINGA B** (1992): Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors. *Nucleic Acids Res* 20 (15): 3815–3820.
- WALKER JE, SARASTE M, RUNSWICK MJ, GAY N** (1982): Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945–951.
- WALLENSTEIN S, ZUCKER CL, FLEISS JL** (1980): Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47 (1): 1–9.
- WOLLHEIM CB** (2000): Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. *Diabetologia* 43 (3): 265–277.
- YAMADA K, JI JJ, YUAN H, MIKI T, SATO S, HORIMOTO N, SHIMIZU T, SEINO S, INAGAKI N** (2001): Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science* 292 (5521): 1543–1546.
- ZAWAR C, NEUMCKE B** (2000): Differential activation of ATP-sensitive potassium channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat hippocampus. *Pflügers Arch* 439 (3): 256–262.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	Adenin
A	Stromstärke in Ampere; $\text{pA} = 10^{-12} \text{ A}$
Abb.	Abbildung
ABC-Protein	„ATP-binding cassette“-Protein
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP-PCP	Adenosin-5'-(β,γ -methylen)-diphosphat
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)-diphosphat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP γ S	Adenosin-5'-(γ -thio)-triphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin
C166S	Austausch der Aminosäure Cystein in Positon 166 gegen Serin
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“
Ci	Radioaktivität in Curie ($1 \text{ Curie} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$); $\mu\text{Ci} = 10^{-6} \text{ Ci}$
CMF-PBS	Phosphatpuffer (s. 3.2.8.2)
COS	CV-1, Origin of SV40 (s. 3.2.8.1)
Cre	„ <u>c</u> auses <u>r</u> ecombination“
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethanol
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg
DMEM	Dulbecco modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute („disintegrations per minute“)
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Aminosäure Glutamat
E23K	Austausch der Aminosäure Glutamat in Position 23 gegen Lysin
EC ₅₀	halbmaximal wirksame Substanzkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E _{max}	maximaler Effekt
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EZ	extrazelluläre Lösung
Fa.	Firma
FADH ₂	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	Fötales Kälberserum

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

g	Guanin, Gravitationsbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$) bzw. Einheit der Masse (Gramm): $\text{mg} = 10^{-3} \text{ g}$; $\mu\text{g} = 10^{-6} \text{ g}$; $\text{ng} = 10^{-9} \text{ g}$
G132S	Austausch der Aminosäure Glycin in Position 132 gegen Serin
G334D	Austausch der Aminosäure Glycin in Position 334 gegen Aspartat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GLUT	Glucosetransporter
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
$[^3\text{H}]$	Tritium (Isotop des Wasserstoffs)
ha	Hamster
HbA _{1c}	glucosyliertes Hämoglobin
HCl	HCl-Lösung („Salzsäure“)
HBSS	„Hepes buffered saline solution“; HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
Hrsg.	Herausgeber; herausgegeben
hu	human
Hz	Frequenz in Hertz (1/s): $\text{kHz} = 10^3 \text{ Hz}$
I337V	Austausch der Aminosäure Isoleucin in Position 337 gegen Valin
IC ₅₀	halbmaximal inhibitorische Substanzkonzentration
IE	Internationale Einheiten
IZ	intrazelluläre Lösung
J	Einheit der Energie (Joule): $\text{mJ} = 10^{-3} \text{ J}$
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KOH	Kaliumhydroxid-Lösung (Kalilauge)
kb	Kilobasen; entsprechend 1000 Basenpaaren
KCO	Kaliumkanalöffner („K ⁺ channel opener“)
K _D	Dissoziationskonstante
Kir	einwärtsgerichteter Kaliumkanal
konz.	konzentriert
l	Volumen in Liter: $\text{ml} = 10^{-3} \text{ l}$; $\mu\text{l} = 10^{-6} \text{ l}$
L	Aminosäure Lysin
L270V	Austausch der Aminosäure Leucin in Position 270 gegen Valin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Kulturmedium für Bakterien, s. 3.2.4.1)
loxP	„locus of crossover (x) in P1“
m	Länge in Meter: $\mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$; $\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$
M	Molarität (mol/l): $\text{mM} = 10^{-3} \text{ mol/l}$; $\mu\text{M} = 10^{-6} \text{ mol/l}$; $\text{nM} = 10^{-9} \text{ mol/l}$
MDR	„Multidrug Resistance Protein“
MG	Molekulargewicht
MgADP	Komplex von ADP und einem Mg ²⁺ -Ion
MgGDP	Komplex von GDP und einem Mg ²⁺ -Ion
min	Minuten
mKir6.2	Kir6.2 der Maus
MRP	„Multidrug Resistance-associated Protein“
mt	Mutante
n	Hill-Koeffizient (Steigungskoeffizient)
N	Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	NaOH-Lösung („Natronlauge“)
NBF	Nukleotid bindende Region („nucleotide binding fold“)
NDPK	Nukleosiddiphosphatkinase
Neo	Neomycin-Resistenzgen
Nr.	Nummer (auch: „#“)
Ω	Einheit des elektrischen Widerstands (Ohm): $M\Omega = 10^6 \Omega$; $G\Omega = 10^9 \Omega$
P	Signifikanz
[^{32}P]	radioaktives Isotop des Phosphor
P1075	N-Cyano-N'-(1,1-dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
p.a.	pro Analyse
PBS	„phosphate-buffered saline“; phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIP ₂	1-Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat
pH	pH-Wert
PHHI	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kleinkindes („persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy“)
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RZPD	„Resource Center of the German Human Genome Project“ / Primary Database
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
s. (o./u.)	siehe (oben/unten)
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SNP	„single nucleotide polymorphism“
SSC	„Sodium salt citrate“; Natriumcitrat (s. 3.2.7.2.3)
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor („sulfonylurea receptor“)
t	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	„Tris buffered saline“
TE	Tris-EDTA
Template	Ausgangs-DNA
TMD	transmembranäre Domäne; Serie membranumspannender Segmente
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheiten („Units“)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
v/v	Volumenkonzentration (Volumen/Volumen)
V	Einheit der Spannung (Volt): $mV = 10^{-3} V$
w/v	Massenkonzentration (Masse/Volumen)
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel